

TRANSCRIPTION DES COLIPHAGEN M 13
IN VIVO
DATEN ZUM LEBENSZYKLUS DER
VIRALEN INFORMATORISCHEN RNA

Karl Friedrich Wanner

1976

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
bei München

Abteilung für Virusforschung

Direktor: Professor Dr. Dr. P. H. Hofschneider

Transcription des Coliphagen M13 in vivo
Daten zum Lebenszyklus der viralen informatorischen RNA

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in
der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Karl Friedrich Wanner

aus Berlin.

München 1975

1. Berichterstatter: Prof. Dr. P. H. Hofschneider

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 1976.



Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit zwischen Sommer 1970 und Herbst 1974 im Max-Planck-Institut für Biochemie in München, später in Martinsried, unter Leitung von Herrn Professor Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Hofschneider bin ich zu Dank verpflichtet, weil er mir die Möglichkeit gab, mich in ein medizinfremdes, zwischen Virologie und Makromolekularbiologie anzusiedelndes, Spezialgebiet gründlich einzuarbeiten. Der Max-Planck-Gesellschaft danke ich für ein Ausbildungsstipendium.

Fräulein Helma Hohmann unterstützte einen Teil der Arbeiten wesentlich durch unermüdlichen Fleiß und große experimentelle Sorgfalt.

"Nicht deshalb ist etwas wahr, weil
es nützlich ist, sondern immer wieder,
weil und indem und sofern es wahr ist,
ist es nützlich."

ERNST BLOCH anlässlich seiner Antritts-
vorlesung in Leipzig 1949.

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
A. <u>Zusammenfassung</u>	1
B. <u>Einleitende Übersicht</u>	4
1. "Kleine DNA-Phagen"	4
2. Der Reproduktionszyklus von M13	7
3. Die RNA der kleinen DNA-Phagen	10
3.1 Vorbemerkung zum Thema Transcription	10
3.2 Die Struktur der viralen mRNA	13
3.3 Größenverteilung der mRNA	13
3.4 Die Bedeutung überlanger phagenspezifischer RNA	16
3.5 Die Inaktivierung und Degradation von mRNA	18
3.6 Stabilität der mRNA kleiner DNA-Phagen	20
4. Zusammenfassung der speziellen Fragestellungen	22
C. <u>Methodische Vorbemerkungen</u>	23
1.1 Das "Pulse-Chase"-Experiment	23
1.2 Rifampicin und "Chase"	25
2. Charakterisierung von in vivo synthetisierten M13-RNA-Molekülen	27
2.1 Hybridisation	27
2.2 Fraktionierung und Hybridisation	28
3. M13-Gen-5-mRNA: Synthesekapazität und biologische Halbwertszeit	30
D. <u>Methodische Vorarbeiten zu den Experimenten</u>	32
1. Isolation der Mutante E. coli K12 AB301 NTG-Rif ^S	32
1.1 Nitrosoguanidin-Mutagenese und Ampicillin-Selektion	32
1.2 Eigenschaften von AB301 NTG-Rif ^S	33
2. Isolation von M13-RF-DNA	37
2.1 Isolation einer tritiierten M13-RF-DNA als Marker	38

	Seite
D. 2.2 Großkultur von 200 Litern M13-infizierter Bakterien	41
2.3 Säulenchromatographie	42
E. <u>Durchführung der Experimente</u>	49
1. M13-spezifische RNA in E. coli AB301 NTG-Rif ^S : Abschätzung der durchschnittlichen Molekülgröße des primären Transcriptionsprodukts und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit	49
2. Isolation und Identifikation des M13-Gen-5-Produkts	52
3. Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt während des Infektionszyklus beziehungsweise in Gegenwart von Rifampicin	57
4. M13-spezifische RNA in E. coli AB301-105 (RNAase III ⁻)	59
4.1 Wachstumseigenschaften der Mutante AB301-105 in einem vollsynthetischen Medium	59
4.2 Molekulargewichtsverteilung M13-spezifischer RNA in AB301-105 und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit	61
F. <u>Ergebnisse und Schlußfolgerungen</u>	63
1. M13-spezifische RNA in E. coli AB301 NTG-Rif ^S : Abschätzung der durchschnittlichen Molekülgröße des primären Transcriptionsprodukts und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit	63
1.1 Synthese zellspezifischer und phagenspezifischer RNA in Gegenwart von Rifampicin	63
1.2 Ein Nebenbefund: Instabilität ribosomaler RNA in Gegenwart von Rifampicin	70
1.3 Physikalische Halbwertszeit M13-spezifischer RNA in AB301 NTG-Rif ^S	71
2.1 Anstieg der Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt nach Infektion von AB301 NTG-Rif ^S mit M13 Wildtyp	75

	Seite
F. 2.2 Biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA in AB301 NTG-Rif ^S	80
3. Molekulargewichtsverteilung M13-spezifischer RNA in AB301-105 und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit	84
3.1 Nachweis der Wirksamkeit der verwendeten Rifampicin-Konzentration	85
3.2 Molekulargewichtsverteilung der RNA in AB301-105	88
3.3 Synthese- und Abbaukinetik der RNA in AB301-105	94
4. Schlußbetrachtung	97
5. Praktikable, weiterführende Experimente	100
G. <u>Materialien und Standardtechniken</u>	101
H. <u>Erläuterung von Abkürzungen und ausgewählten Begriffen</u>	107
I. <u>Literaturverzeichnis</u>	110

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Kultur von AB301 NTG-Rif ^S in modifiziertem H-Medium	35
Abb. 2: Reinigung einer tritierten M13-RF-DNA durch Zentrifugation über einen alkalischen Saccharose-Gradienten	39
Abb. 3: Zweiter Schritt der Reinigung einer tritierten M13-RF-DNA über einen neutralen Niedrigsalz-Saccharose-Gradienten	40
Abb. 4: Chromatographische Vorreinigung der M13-RF-DNA über eine Sepharose-Säule	44
Abb. 5: Ultrazentrifugation konzentrierter Säulen-Eluat-Fraktionen über alkalische Saccharose-Gradienten	45
Abb. 6: M13-RF-DNA. Elektronenmikroskopische Aufnahme	46

	Seite
Abb. 7: Präparative Reinigung von M13-RF-DNA durch Zonalzentrifugation	47
Abb. 8: Identifikation des M13-Gen-5-Proteins durch Cochromatographie über eine Einzelstrang-DNA-Cellulose-Säule	55
Abb. 9: Kultur von AB301-105 in vollsynthetischem Medium	60
Abb. 10: Coli-spezifische und M13-spezifische RNA in AB301 NTG-Rif ^S	65
Tabelle 1: Synthese und Abbau verschiedener RNA-Spezies aus AB301 NTG-Rif ^S in Gegenwart von Rifampicin	67
Abb. 11: Physikalische Halbwertszeit M13-spezifischer RNA in AB301 NTG-Rif ^S	72
Abb. 12: Acrylamid-Gelelektrophorese von M13-Gen-5-Protein mit Referenzproteinen	76
Abb. 13: Anstieg der Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Protein nach Infektion von AB301 NTG-Rif ^S mit M13 Wildtyp	77
Abb. 14: Biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA	80
Abb. 15: Einwirkung von 300 µg/ml Rifampicin auf den RNA-Stoffwechsel in M13-infizierten AB301-105	86
Abb. 16: Coli-spezifische und M13-spezifische RNA in AB301-105	90
Abb. 17: Acrylamid-Gelelektrophorese in Formamid zur Desaggregationskontrolle von RNA	92
Tabelle 2: Synthese und Abbau der Gesamt-RNA und der M13-spezifischen RNA aus AB301-105	95

A. Zusammenfassung

Das Wesen einer Virusinfektion besteht darin, daß die infizierte Zelle gezwungen wird, ihren Stoffwechsel zugunsten der Synthese virusspezifischer Produkte umzustellen. Der Infektionsprozeß endet in vielen Fällen mit dem Tod der Zelle und der Freisetzung infektiöser Partikel. Bei den meisten Bakteriophagen verhält es sich ähnlich.

Das Besondere an der Infektion bestimmter Colibakterien mit dem Bakteriophagen M13 ist, daß dieser den zellulären Stoffwechsel nur geringfügig beeinflusst. Die Synthesen zellulärer und phagenspezifischer Produkte laufen ungestört nebeneinander ab; es scheint, als würden Synthese, Zusammenbau und Freisetzung neu synthetisierter Phagen von der Zelle als zusätzliche Aufgaben gleichsam nebenher erledigt. Es stellt sich die Frage, wie es dem Bakteriophagen gelingt, überschüssige Kapazitäten des zellulären Stoffwechsels für die Ausprägung der eigenen genetischen Information zu aktivieren und optimal einzusetzen.

Das Genom des Bakteriophagen M13 ist eine circuläre, einzelsträngige DNA des Molekulargewichts 1.7×10^6 . Die infizierende DNA wird zunächst in einen Doppelstrang umgewandelt. Die Ausprägung des Phagengenoms beginnt, indem an dem Doppelstrang eine RNA synthetisiert wird, die als Matrize für die Proteinsynthese zur Verfügung gestellt wird.

Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchungen waren zwei Ergebnisse bezüglich der Eigenschaften phagenspezifischer RNA. Erstens: Neben kleineren, phagenspezifischen RNA-Molekülen wurden solche von Genomlänge gefunden. Die lange RNA schien ein instabiles Zwischenprodukt zu sein; die kleineren Moleküle, so vermutete man, stellen die Matrizen-RNA dar. Zweitens: Die phagenspezifische Matrizen-RNA ist sechs- bis achtmal stabiler als zelluläre Matrizen-RNA.

Daraus wurde eine Arbeitshypothese abgeleitet, die besagte, daß einerseits die Art und Weise, in der phagenspezifische RNA synthetisiert wird, und andererseits die Stabilität der RNA zwei Faktoren sein müßten, die die Ausprägung der genetischen Information des Phagen wesentlich begünstigen könnten. Je länger die zunächst synthetisierten, phagenspezifischen RNA-Moleküle sind, desto seltener bräuchte RNA-Synthese zu starten. Im Prinzip könnte an der circulären DNA des Phagen eine RNA von unendlicher Länge synthetisiert werden, von der dann jeweils nach Fertigstellung Einheiten von Matrizen-RNA abgeschnitten würden. Bereits ein Startereignis würde zu einer Vielzahl phagenspezifischer Matrizen-RNA-Moleküle führen. Könnte man zudem davon ausgehen, daß die phagenspezifische RNA nicht nur, wie bereits festgestellt, als Molekül äußerst stabil ist, sondern eine entsprechend hohe funktionelle Stabilität aufweist, würde beides zusammengenommen einen wesentlichen Vorteil für die phagenspezifische Makromolekülsynthese bedeuten.

Die Experimente haben ergeben, daß die Arbeitshypothese teilweise richtig war. Es gelang, in einer speziellen Bakterienmutante nach Infektion phagenspezifische RNA-Moleküle von mehrfacher Genomlänge zweifelsfrei nachzuweisen. Diese Moleküle hätten als Hinweis auf den oben skizzierten Prozeß der phagenspezifischen RNA-Synthese gedeutet werden können, wenn sich hätte zeigen lassen, daß die langen Moleküle in kürzere Einheiten von Matrizen-RNA zerlegt werden oder selbst als Matrize aktiv sind. Beides ist nicht der Fall. Es ließ sich eindeutig zeigen, daß die lange RNA nicht zu kleineren Einheiten zerfällt. Gegen die biologische Aktivität der langen RNA spricht, daß sich der Phage in der Mutante deutlich schlechter vermehrt als in Bakterien, die diese lange RNA nicht aufweisen. Es wurde daraus geschlossen, daß die gefundenen langen RNA-Moleküle nicht verwertbare Produkte eines pathologischen Syntheseprozesses sind.

Darauf, was die Grundlage für den pathologischen Stoffwechselweg ist, ergaben sich erste konkrete Hinweise. Des weiteren gelang es, am Beispiel eines phagenspezifischen Proteins zu zeigen, daß die korrespondierende Matrizen-RNA, die nur auf Grund ihrer Funktion, nicht jedoch als Molekül identifizierbar ist, tatsächlich strukturell und funktionell stabiler ist als zelluläre Matrizen-RNA.

Dieses Ergebnis ist nur eine Teilantwort auf die ursprüngliche Frage, in welcher Weise sich der Phage gegenüber der Bakterienzelle durchsetzt. Allerdings darf angefügt werden, daß in der gesamten Virologie diesbezüglich noch weitgehend Unklarheit herrscht.

B. Einleitende Übersicht

1. "Kleine DNA-Phagen"

Bakteriophagen (d'Hérelle, 1921) sind Viren, die den Stoffwechselapparat von Bakterien benutzen, um sich zu vermehren (Übersichten: Adams, 1959; Stent, 1963). Auf sie trifft daher folgende Definition der Viren zu:

"Viruses are entities whose genome is an element of nucleic acid, either DNA or RNA, which reproduces inside living cells and uses their synthetic machinery to direct the synthesis of specialized particles, the virions, which contain the viral genome and transfer it to other cells."

(Luria and Darnell, 1967)

Der eigentümliche Name Bakteriophage (Bakterienfresser) ist historisch begründet. Das Phänomen Bakteriophagie, das Twort 1915 und d'Hérelle 1917 erstmals beschrieben (Literaturzitate siehe: Adams, 1959), nämlich der zunächst unerklärliche Untergang einer Bakterienkultur, erwies sich als eine Form der Virusinfektion, die regelmäßig zur Zerstörung der befallenen Bakterien unter Freisetzung neuentstandener Viruspartikel führt, also als eine lytisch-produktive Infektion.

Der Name Bakteriophage ("Phage") besteht, wörtlich genommen, insofern nicht für alle Bakterienviren zu Recht, als für einzelne von ihnen auch nicht-lytisch-produktive und unproduktive, latente, Formen der Infektion gefunden wurden. Im letztgenannten Fall bleibt die Virusproduktion die seltene, von besonderen Bedingungen abhängige, Ausnahme.

Für die nicht-lytisch-produktive Infektion ist charakteristisch, daß die Anwesenheit und Expression viraler genetischer Information das Bakterienwachstum kaum beeinträchtigt. Es stellt sich ein Stoffwechselgleichgewicht ein, das beiden, dem infizierten Bakterium und dem Phagen, eine Vermehrung erlaubt. Reife Phagen werden kontinuierlich durch Poren in Membran und Zellwand ausgeschleust, Lyse findet nicht statt.

Die Gruppe der fd-Phagen von *Escherichia coli* (Übersicht: Marvin und Hohn, 1969), zu der M13 gehört, ist hierfür das bekannteste Beispiel (Hofschneider und Preuss, 1963; Hoffmann-Berling und Mazé, 1964).

Diese ungewöhnliche Spielart des Parasitismus, die Koexistenz eines Virus mit dem Wirt, deutet darauf hin, wie sehr Viren dem Zellsystem angepaßt sein können, das sie zu ihrer Erhaltung und Vermehrung benutzen.

Das Ausmaß der Anpassung läßt sich besonders plastisch am Beispiel der kleinen DNA-Phagen erläutern, die nach einer willkürlichen Definition "less genetic information than the equivalent of a Watson-Crick double helix of 5×10^6 molecular weight" tragen (Ray, 1968). Die am häufigsten untersuchten Vertreter dieser Gruppe sind der sphärische, lysierende Coliphage ϕ X174 (Übersicht: Sinsheimer, 1968) und die fädigen, nicht lysierenden Coliphagen fd, f1 und M13.

Daß die geringe Menge genetischer Information, welche die kleinen DNA-Phagen in Gestalt ihrer DNA in die Bakterienzelle einführen, diese fast vollständig vom zellulären Stoffwechsel abhängig macht, soll eine kurze Überlegung zeigen, bei der genetische Information in Funktion, beziehungsweise Nucleinsäure in Proteinäquivalente, umgerechnet wird.

M13 enthält auf seiner einzelsträngigen (Salivar et al., 1964), circulären (Marvin und Schaller, 1966) DNA des Molekulargewichts 1.7×10^6 (Halsall und Schumaker, 1972) acht komplementierbare Cistren (Pratt et al., 1966, 1969), die mittels der Rekombinationsmethode kartiert wurden (Lyons und Zinder, 1972).

Würde in vivo die gesamte DNA des Phagen in Protein übersetzt, was sicherlich nicht zutrifft, ergäbe sich eine Polypeptidkette des Molekulargewichts von ungefähr 1.7×10^5 . Zum Vergleich: Die DNA-Polymerase I von *E. coli* hat ein Molekulargewicht von 1.09×10^5 (Jovin et al., 1969) und die kleinste bekannte RNA-Polymerase des Coli-Systems,

die des Phagen T7, ein Molekulargewicht von 1.1×10^5 (Chamberlin et al., 1970).

Aus dieser überschlägigen Berechnung ergibt sich, daß die kleinen DNA-Phagen kaum genügend Information besitzen, um wenigstens eines der Schlüsselenzyme für die Nucleinsäuresynthese zu codieren.

Man kann aus dieser Überlegung die verallgemeinernde Aussage ableiten, daß die kleinen DNA-Phagen alle wesentlichen Elemente des makromolekularen Stoffwechsels der Bakterien benutzen. Phagencodierte Proteine, sofern sie nicht Strukturproteine darstellen, begünstigen lediglich die Phagenreproduktion, indem sie Enzymspezifitäten modifizieren und Syntheseraten regulieren und damit vorhandene Synthesekapazitäten auf phagenspezifische Produkte umleiten. Die Stoffwechselprozesse verlaufen vermutlich in hohem Maße ähnlich oder gleich, ob nun bakterienspezifische oder phagenspezifische Produkte synthetisiert werden.

Daraus ergibt sich der Grund für das unvermindert große Interesse der aktuellen Forschung an den kleinen DNA-Phagen: Das einfachere Phagen-System bietet den Vorteil des einfacheren experimentellen Zugangs, während das hohe Maß an Homologie der Syntheseprozesse in gewissen Grenzen den Rückschluß vom Phagen-System auf das, gemessen an der vorhandenen Menge genetischer Information, tausendfach komplexere Coli-System erlaubt.

2. Der Reproduktionszyklus von M13

Der Reproduktionszyklus von M13 läuft in vier Phasen ab, Adsorption, Infektion, Latenzphase und Freisetzung neu gebildeter Phagen. Die dabei stattfindenden Prozesse sollen hier nur insoweit skizziert werden, als es das Verständnis der in der vorliegenden Arbeit behandelten Probleme erfordert. (Einzelheiten und detailliertere Literaturzitate finden sich in den Übersichten: Marvin und Hohn, 1969; Kornberg, 1974).

M13 infiziert nur Coli-Stämme, die F-Pili ausbilden. M13 adsorbiert an der Spitze der Pili. Adsorption an anderen Stellen der Zelloberfläche führt nicht zur Infektion. Unmittelbar nach der Adsorption verkürzt sich der Pilus; dies scheint mit dem Eindringen der Phagen-DNA einherzugehen (Jacobson, 1972). Die Proteinhülle des Phagen wird größtenteils abgestreift und bleibt in der Membran liegen (Trenkner et al., 1967; Henry und Brinton, 1971; Jazwinski et al., 1973).

Neben der Nucleinsäure gelangt vor allem das A-Protein in die Zelle. Beim A-Protein handelt es sich um das Gen-3-Produkt des Phagen. Es hat ein Molekulargewicht von 70 000 und kommt nur in wenigen Exemplaren (1 - 3) in der Proteinhülle des Phagen vor. Das A-Protein vermittelt die Bindung der eingedrungenen Phagen-DNA an die innere Zellmembran (Jazwinski et al., 1973). Eine bisher nicht charakterisierte, bakterielle RNA-Polymerase synthetisiert ein kurzes RNA-Stückchen an der DNA, das nunmehr als "primer" für die Synthese des komplementären DNA-Stranges dient (Brutlag et al., 1971; Wickner, W. et al., 1972; Wickner, R.B. et al., 1972; Wickner, S., und Hurwitz, 1974; Wickner, W., und Kornberg, 1974). Mit der Umwandlung der eingedrungenen, einzelsträngigen Phagen-DNA in ein doppelsträngiges, ringförmiges Molekül ist die Infektion abgeschlossen. Die Phagen-DNA ist ohne Einsatz phagenspezifischer Funktionen in eine bakterienkonforme Duplex-Struktur verwandelt worden ("parentale Replicative Form", Pratt und Erdahl, 1968).

Während der sich anschließenden Latenzphase, in der keine infektiösen Viruspartikel nachweisbar sind, werden an der parentalen RF-DNA und an weiteren, neuentstandenen RF-Molekülen bis zu dreihundert Tochter-RF-Moleküle synthetisiert. Diese Multiplikation der RF-DNA setzt eine phagenspezifische Funktion voraus, die des Gen-2-Produkts. Bei Mutanten im Gen 2 bleibt die Infektion auf der Stufe des parentalen RF stehen. Man muß annehmen, daß der parentale RF erst einmal transkribiert wird, damit RNA zur Synthese des Gen-2-Proteins zur Verfügung steht. Erst danach kann die Replication fortschreiten. Theoretische Überlegungen führen zu dem Schluß, daß das Gen-2-Protein eine Nuclease sein muß; dies bleibt noch zu bestätigen.

Aus den Untersuchungen an kleinen DNA-Phagen haben sich wesentliche Erkenntnisse über die DNA-Replication ergeben. Dem kam zugute, daß RF-Moleküle und ähnlich strukturierte virale und extrachromosomale DNA-Moleküle erheblich leichter analysierbar sind als die bakterielle DNA. Die Analogien in der Replication beider DNA-Typen müssen aber im einzelnen nachgewiesen werden.

Eine Analogie besteht in der Abhängigkeit der RF-Multiplikation von der Synthese einer "primer"-RNA wie bei der Replication der bakteriellen DNA (Lark, 1972).

Weiterhin ist die Replication der M13-RF-DNA von der dnaB-Funktion abhängig (Olsen et al., 1972). Dabei handelt es sich um eine genetisch determinierte, als Protein gereinigte, jedoch noch nicht näher charakterisierte Funktion der bakteriellen DNA-Synthese (Wright et al., 1973; Wickner, S., und Hurwitz, 1974).

Die Tochter-RF-Moleküle fungieren als Matrizen für die Transcription (siehe folgenden Abschnitt). In dem Maße, in dem RF-Moleküle für die Transcription zur Verfügung stehen, werden phagenspezifische Proteine synthetisiert.

Von den acht M13-spezifischen Proteinen waren bisher nur drei einer genaueren Untersuchung zugänglich: die beiden Hüllproteine von M13, das Gen-3- und das Gen-8-Produkt, sowie das Gen-5-Produkt. Diese drei Proteine steuern die

Endphase des Reproduktionszyklus, die Synthese der viralen DNA, die Phagenreifung und -freisetzung.

Gegen Ende der Latenzphase verschiebt sich die DNA-Replication zugunsten der Synthese des viralen Stranges (Staudenbauer und Hofschneider, 1972a). Auch die Einzelstrangsynthese setzt die Synthese einer "primer"-RNA voraus (Staudenbauer und Hofschneider, 1972b).

Das Gen-5-Protein stabilisiert die neusynthetisierten viralen Einzelstränge. Es bindet über die gesamte Länge an die virale DNA und verhindert dadurch ihre Komplementation zu RF-DNA (Henry und Pratt, 1969; Salstrom und Pratt, 1971; Oey und Knippers, 1972; Alberts et al., 1972; Staudenbauer und Hofschneider, 1973).

Eingehüllt in Gen-5-Protein wird die Phagen-DNA in die Nähe der Zellmembran transportiert. Dort hat sich inzwischen ein Vorrat der beiden Hüllproteine angesammelt. Das Gen-5-Protein wird abgestreift und durch Hüllprotein ersetzt, während sich der reifende Phage durch die Zellmembran schiebt. Infektiöse Viruspartikel sind somit in der Zelle niemals nachweisbar.

Wenn die ersten Phagen freigesetzt werden, sind vom Zeitpunkt der Adsorption ab etwa zwanzig Minuten vergangen, etwa die Hälfte der Generationszeit der Bakterien.

3. Die RNA der kleinen DNA-Phagen

3.1 Vorbemerkung zum Thema Transcription

Für die kleinen DNA-Phagen gilt wie für kompliziertere Organismen das "Zentrale Dogma" der Molekularbiologie (vgl. Watson, 1970): Die RF-DNA dient als Matrize für die Synthese phagenspezifischer RNA, die ihrerseits informatorischen Charakter besitzt und phagenspezifische Proteine codiert.

Schlüsselenzym ist die bakterielle RNA-Polymerase. Sie erkennt auf der RF-DNA eine spezifische Nucleotidsequenz, den Promotor, an den sie bindet. Auf der DNA ist jede genetische Information zweimal vorhanden, einmal - direkt abgreifbar - auf dem codogenen und einmal in Spiegelschrift auf dem komplementären Strang. Dies bedeutet hohe Stabilität der genetischen Information, da jeder Fehler auf einem der beiden Stränge durch Vergleich mit der jeweils komplementären Matrize erkannt und korrigiert werden kann. Es setzt aber voraus, daß die RNA-Polymerase den jeweils codogenen Strang erkennt, denn nur das Transcriptionsprodukt des codogenen Stranges ergibt einen Sinn.

Die RNA-Polymerase "schmilzt" die doppelsträngige DNA über eine kurze Strecke hinweg in Einzelstränge auf, selektioniert den codogenen Strang, bestimmt die Transcriptionsrichtung und initiiert eine Polyribonucleotidkette. Initiierende Nucleotide sind offenbar nur 5'-pppA und 5'-pppG.

Die entstehende RNA-Kette hat eine zum codogenen Strang komplementäre Nucleotidsequenz. Die Kette wird verlängert, bis die RNA-Polymerase ein bisher nicht charakterisiertes Terminationssignal erhält. Dann wird die synthetisierte RNA-Kette freigesetzt, die RNA-Polymerase verläßt die DNA und sucht erneut einen Promotor.

Eine RNA, die die Synthese von Polypeptiden instruiert, nennt man Matrizen-RNA (mRNA). Sie enthält die Information für ein oder mehrere Proteine, ist mono- oder polycistronisch. Jeweils drei Nucleotide codieren eine be-

stimmte Aminosäure. Somit ist ein Nucleotid-Triplett die kleinste codierende Einheit, ein Codon.

Es wurde gezeigt, daß RNA bereits in statu nascendi als Matrize für die Proteinsynthese fungieren kann. In manchen Fällen ist das primäre Transcriptionsprodukt jedoch noch nicht biologisch aktiv; beispielsweise könnte es so lang sein, daß es eine Reifung zu kleineren, sekundären Einheiten hin durchmachen muß, ehe es zur Proteinsynthese benutzt wird. Diese Reifung besteht im wesentlichen aus einem "Zurechtschneiden". Dieser Fall ist prinzipiell bei den kleinen DNA-Phagen vorstellbar, da die Circularität ihrer DNA die Synthese einer RNA von mehrfacher Genomlänge erlauben würde. Geht man davon aus, daß, aus welchem Grund auch immer, das Terminationssignal von der RNA-Polymerase nicht regelmäßig erkannt und befolgt wird, würde als primäres Transcriptionsprodukt eine überlange RNA synthetisiert.

Die Frage nach der Existenz und Bedeutung einer überlangen, M13-spezifischen RNA umfaßt einen wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit.

Die Translationsarbeit wird von Ribosomen geleistet. Sie gleiten über die mRNA, erkennen das Startcodon pApUpGp, initiieren eine Polypeptidkette und setzen die Synthese fort, bis sie eine Sequenz von Terminationscodons erreichen. Dort entläßt jedes Ribosom seine Polypeptidkette und zerfällt, um sich für einen neuen Translationsprozeß zu regenerieren. Die neusynthetisierte Polypeptidkette muß in manchen Fällen noch zurechtgeschnitten werden, ehe sie sich auffalten und die Konformation des funktions-tüchtigen Proteins annehmen kann.

Die mRNA ist ein Zwischenprodukt, ein Arbeitsmolekül. Zu ihren Wesen gehört, daß sie nicht stabil ist. Die Zelle verfügt nur dann über eine wirksame Kontrolle der Genexpression, wenn die Phase der biologischen Aktivität einer mRNA begrenzt ist. Meistens ist mRNA nur eine bis wenige Minuten biologisch aktiv, so daß an jedem mRNA-Molekül

eine begrenzte Anzahl von Polypeptidketten synthetisiert wird.

Eine wesentliche Kennzahl für ein instabiles Molekül ist die Halbwertszeit, die Spanne, innerhalb derer die Hälfte einer Population identischer Moleküle eine bestimmte Eigenschaft einbüßt. mRNA wird zunächst inaktiviert. Das Molekül selbst beziehungsweise seine Fragmente bleiben noch längere Zeit in der Zelle nachweisbar, bis sie zu kurzen Nucleotidketten abgebaut sind. Man unterscheidet deshalb eine biologische und eine physikalische Halbwertszeit. Die biologische Halbwertszeit ist die wichtigere Größe, sie beschreibt die Kurve, mit der die Translatierbarkeit einer Population identischer mRNA-Moleküle abnimmt. Die physikalische Halbwertszeit hingegen sagt lediglich etwas darüber aus, wie lange eine bestimmte mRNA-Spezies physikochemisch nachweisbar bleibt.

Diese Unterscheidung ist keineswegs nur akademisch. Ein einzelner, von einer Nuclease bewirkter, Schnitt scheint eine mRNA bereits zu inaktivieren, während das Molekül noch längere Zeit danach in der Zelle existiert. Da die Folgen des inaktivierenden Schnittes mit den heute zugänglichen Techniken noch nicht darstellbar sind, kann man die biologische Aktivität am Molekül selbst nicht erkennen, das einzige Kriterium ist die Kapazität, Proteinsynthese in vivo zu stimulieren. Die Synthesekapazität einer mRNA zu analysieren, macht häufig Schwierigkeiten, da das die Isolation des betreffenden Produkts voraussetzt. Lange Zeit mußte man sich überhaupt darauf beschränken, die physikalische Halbwertszeit zu bestimmen.

Untersuchungen über die physikalische Halbwertszeit der M13-spezifischen RNA ergaben Werte, die erheblich über den von der bakteriellen mRNA bekannten Werten liegen. Ließe sich zeigen, daß mit der hohen physikalischen Halbwertszeit eine vergleichbar hohe biologische Halbwertszeit und damit eine hohe funktionelle Stabilität der M13-spezifischen RNA verbunden ist, ergäbe sich dar-

aus eine der möglichen Antworten auf die Frage, wie sich der Phage gegenüber der Zelle durchsetzt.

Mit dem Problem der funktionellen Stabilität der M13-spezifischen RNA beschäftigt sich ein weiterer Teil dieser Arbeit.

3.2 Die Struktur der viralen mRNA

In vivo ist offenbar nur der zur Phagen-DNA ("Plus-Strang") komplementäre "Minus-Strang" der RF-DNA codogen; dies haben Untersuchungen an ϕ X174 (Hayashi et al., 1963) und an M13 (Jacob und Hofschneider, 1969) gezeigt. Die Nucleotidsequenz der viralen mRNA ist demnach homolog mit der des Plus-Stranges.

Die Transcriptionsrichtung ist an ϕ X174-RF-DNA in vitro 5' $\rightarrow$ 3' (Tonegawa und Hayashi, 1966); dies stimmt mit Befunden an bakteriellen Systemen überein.

3.3 Größenverteilung der mRNA

Die kleinen DNA-Phagen sind wiederholt als Modellsystem benutzt worden, um Daten über die Größe von Transcriptionseinheiten und die Molekulargewichte von Transcriptionsprodukten zu erarbeiten. Das Interesse ergab sich vermutlich aus den prinzipiell unterschiedlichen Möglichkeiten, welche die Circularität der RF-DNA eröffnet.

Folgt man den verschiedenen Befunden, stellt man fest, daß bei den kleinen DNA-Phagen drei grundverschiedene Möglichkeiten realisiert zu sein scheinen:

1. Die Transcriptionseinheiten sind klein und umfassen nur eines oder wenige Cistren.
2. Die Transcriptionseinheit ist identisch mit der Genomlänge und umfaßt die gesamte genetische Information des Phagen.
3. Die Transcriptionseinheit ist unbestimmt und geht jedenfalls wesentlich über die Länge des Genoms hinaus. Die genetische Information des Phagen ist auf dem Transcriptionsprodukt mindestens teilweise mehrfach enthalten.

Da die vorliegende Arbeit unter anderem ein Versuch sein sollte, Klarheit darüber zu gewinnen, aus welchen Transcriptionseinheiten die phagenspezifische mRNA hervorgeht, wird im Folgenden dargestellt, welche verschiedenen experimentellen Ansätze zu den unterschiedlichen Befunden und Hypothesen geführt haben. Gegenstand der Erörterung sind die Befunde über die Zahl der Promotoren und der Terminationsorte. Weiterhin muß die Frage behandelt werden, ob überlange Transcriptionsprodukte Artefakte oder pathologische Moleküle sind, und, wenn das nicht der Fall ist, ob überlange Transcriptionsprodukte einen Reifungsprozeß zu funktionstüchtiger mRNA durchmachen können.

Über die Zahl der Promotoren lassen sich zweierlei Befunde erheben:

1. RNA-Polymerase bindet an die DNA an spezifischen Stellen, die allgemein als RNA-Polymerase-Bindungsorte bezeichnet werden. Diese Bindung läßt sich unter geeigneten Versuchsbedingungen stabilisieren und der Bindungs-ort mit molekularbiologischen (Green et al., 1970) und neuerdings auch mit elektronenoptischen Methoden darstellen (Bordier und Dubochet, 1974). Eine gewichtige Schwierigkeit ergibt sich daraus, daß die RNA-Polymerase unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Bindungsorten zeigt und daß die spezifische Bindung bei schwacher Affinität von unspezifischer Bindung nur schwer unterschieden werden kann.

2. Wie Sequenzanalysen gezeigt haben, lassen sich RNA-Moleküle auf Grund der Sequenz der initialen Nucleotide klassifizieren. Unter der Voraussetzung, daß die Initiation der Transcription jeweils an identischen Nucleotiden erfolgt, könnten Sequenzanalysen Auskunft über die Zahl der Initiationsorte der Transcription und damit über die Zahl der Promotoren geben.

Als initiale Nucleotide von in vivo an ϕ X174-RF-DNA synthetisierter RNA wurden zu 84 Prozent 5'-pppAp und zu 16 Prozent 5'-pppGp gefunden; in vitro erhobene Daten ergaben annähernd umgekehrte Verhältnisse (Hayashi und Hayashi, 1972). Abgesehen von den Zweifeln, die sich dar-

aus über die Spezifität der in-vitro-Initiation ergeben, deutet dies auf mindestens zwei RNA-Spezies hin, die bei getreuer Transcription von mindestens zwei Initiationsorten aus synthetisiert werden könnten. Andererseits wurden bei ϕ X174 drei RNA-Polymerase-Bindungsorte gefunden (Chen et al., 1973).

In vitro an fd-RF-DNA synthetisierte RNA zeigt eine Verteilung auf mindestens drei Spezies, startend mit den Nucleotid-Tripletts 5'-pppApUpGp, 5'-pppGpUpAp und 5'-pppGpUpUp (Sugiura et al., 1969). Daraus sollte man schließen können, daß es auf der fd-RF-DNA mindestens drei Bindungsorte für die RNA-Polymerase gibt (vgl. auch Okamoto et al., 1972). Ein anderer Befund besagt, daß von zwei RNA-Polymerase-Bindungsorten auf der fd-RF-DNA einer RNA-Polymerase stärker bindet als der andere, was eine Differenzierung zwischen "starken" (bindungsstarken; vgl. Bautz, 1972) und "schwachen" Promotoren erlauben würde (Heyden et al., 1972).

Nicht nur über die Zahl der Promotoren, sondern auch über die Zahl der Terminationsorte und sogar über die Natur des Terminationsereignisses besteht Unsicherheit.

Termination sollte grundsätzlich stattfinden, bevor die RNA-Polymerase einen weiteren Bindungsort erreicht. Die Termination könnte durch ein Terminationssignal auf der DNA (Studier, 1973) oder durch einen Terminationsfaktor erzielt werden. Es gibt Hinweise dafür, daß der Terminationsmechanismus versagen kann, so daß Termination zu einem Zufallsprozeß wird (Hayashi und Hayashi, 1970). Auf diese Weise werden, so muß man folgern, Promotoren überlesen, ohne daß die RNA-Polymerase die DNA verläßt.

Eine Terminationssequenz der DNA wurde bisher nicht identifiziert. Ein Terminationsfaktor hingegen wurde beschrieben. In *Escherichia coli* existiert ein Protein, der Faktor "rho", der für eine spezifische Termination verantwortlich sein soll (Roberts, 1969). Dieser Faktor besitzt keine Nuclease-Aktivität.

In vitro wird in Abwesenheit von rho an fd-RF-DNA RNA von annähernder Genomlänge, sowie RNA von drei distinkten Längen synthetisiert (Takanami et al., 1971). Daraus wurde geschlossen, daß die RNA von drei Promotoren aus bis zu einem einheitlichen Terminator hin transkribiert wird, wobei das Überlesen eines Promotors ein relativ häufiges Ereignis darstellt. In Gegenwart von rho fanden sich mindestens fünf kleinere RNA-Moleküle, die als Produkte spezifischer Termination sowie einer nachfolgenden Reifung angesehen werden könnten.

In vitro wurden an ϕ X174-RF-DNA RNA-Moleküle von einfacher und mehrfacher Genomlänge neben kürzeren RNA-Molekülen synthetisiert (Hayashi und Hayashi, 1970). In vivo wurden zwar auch Moleküle von Genomlänge und größer gefunden, die Moleküle waren jedoch nicht stabil in denaturierenden Agentien, was zum Rückschluß auf unspezifische Wasserstoffbrückenbindungen und damit auf Artefakte führte (Hayashi und Hayashi, 1970; Sedat und Sinsheimer, 1970; Jacob et al., 1973).

Man befindet sich experimentell in dem Dilemma, daß überdurchschnittlich große Moleküle unter dem Verdacht stehen, Artefakte auf Grund von Aggregatbildungen zu sein (Boedtker, 1968), und daß andererseits desaggregierende Agentien, insbesondere Dimethylsulfoxid (DMSO), infolge von Kettenbrüchen zu kleine Molekulargewichte vortäuschen (Duesberg und Vogt, 1973).

Die vorliegende Arbeit wird zeigen, daß überlange phagenspezifische RNA in einer bestimmten Coli-Mutante synthetisiert wird. Die Frage ist, ob diese Moleküle biologische Bedeutung besitzen.

3.4 Die Bedeutung überlanger phagenspezifischer RNA

Eine Beziehung zwischen den gegensätzlichen Befunden über Transcriptionseinheiten ließe sich herstellen, wenn man von der Vorstellung ausginge, daß die überlangen RNA-Moleküle primäre Transcriptionsprodukte sind, die

einen Aktivierungs- beziehungsweise Reifungsprozeß zu kleineren, sekundären Einheiten hin durchmachen müssen (Hercules et al., 1974); nach einer Phase der biologischen Aktivität als Matrize werden diese inaktiviert und schließlich degradiert.

Eine solche dynamische Betrachtungsweise verlangt, daß man zunächst überlange primäre Transcriptionsprodukte nachweist und danach deren Reifung zu kleineren Produkten zeigt.

Reifungsprozesse durch Abspaltung beziehungsweise Molekülteilung sind in der Proteinchemie geläufig. Bei Ribonucleinsäuren animaler Zellen sind Vorläufermoleküle schon seit längerem bekannt (Übersicht: Burdon, 1971). Bei *E. coli* stieß man erst auf Vorläufermoleküle, als es möglich war, die sehr rasch ablaufenden Reifungsprozesse sichtbar zu machen. Als erstes fand man Vorstufen von tRNA, indem man radioaktiv-markierte Bakterien mit Detergens und heißem Phenol öffnete, anstatt zeitraubende Wasch- und Lyse-Prozeduren durchzuführen (Altman, 1971).

Reifungsprozesse bei ribosomaler und informatorischer RNA von Bakterien darzustellen, wurde erst mit Hilfe eines molekularbiologischen Tricks möglich. Man benutzte ein System, das einen Mangel an dem oder einem der Reifungsenzyme aufweist. Die Reifung läuft deshalb nur noch verzögert ab. Es handelt sich um eine RNAase III-Mangelmutante von *E. coli* (Kindler et al., 1973; siehe auch Abschnitt E.4). Bei dieser Mutante fanden sich Vorläufer "früher" T7-RNA und ribosomaler RNA, deren Reifung in vitro mit Hilfe gereinigter RNAase III (Endoribonuclease III, EC 3.1.4.24) nachvollzogen werden konnte (Dunn und Studier, 1973; Nikolaev et al., 1973; Nikolaev und Schlessinger, 1974).

Ziele der RNAase III sind doppelsträngige RNA-Bereiche, sogenannte "Haarnadeln" oder "Schlingen", welche sie endonucleolytisch schneidet (Robertson et al., 1968). Solche spezifischen Konformationen wurden bei "früher" T7-RNA gefunden (Rosenberg et al., 1974).

Die Schlingen könnten nach dem endonucleolytischen Schnitt noch zahlreiche Basenpaare enthalten, welche die Spaltstücke über Wasserstoffbrücken in Aggregaten verbunden halten. Diese Aggregate könnten dann im Prozeß der weiteren Reifung oder bei der Untersuchung mit Wasserstoffbrücken sprengenden Agentien (DMSO) zerfallen.

Wird eine derartige Reifung bei überlanger M13-spezifischer RNA nicht gefunden, liegt der Schluß nahe, daß es sich bei den überlangen RNA-Molekülen um Produkte eines pathologischen Transcriptionsprozesses handelt. Dann ergäbe sich die Frage nach der Ursache für die Entstehung überlanger Transcriptionsprodukte. Sie könnte beispielsweise in mangelhafter Termination zu suchen sein.

3.5 Die Inaktivierung und Degradation von mRNA

Die aktuelle Synthesekapazität einer Zelle für ein Protein bestimmen drei Parameter: die Regulation der mRNA-Synthese (Übersichten: Geiduschek und Haselkorn, 1969; Bautz, 1972), die Regulation der Proteinbiosynthese (Übersicht: Lucas-Lenard und Lipman, 1971) und die Inaktivierungsrate der mRNA.

Die Inaktivierungs- und Degradationsprozesse an der mRNA, welche mit ein Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind, kennt man erst oberflächlich.

In den bisher untersuchten Fällen war die biologische Halbwertszeit immer deutlich kleiner als die physikalische (Schwartz et al., 1970; Blundell et al., 1972). Dem Inaktivierungsprozeß folgt die Degradation nach einer gewissen Latenzphase. Sollte sich diese Latenz für verschiedene Moleküle deutlich unterscheiden, könnte man vermuten, daß sie mit der Molekülkonformation korrelierbar ist, das heißt, mit der Zugänglichkeit für Nucleasen.

Die Degradation hat vermutlich dieselbe Orientierung wie die Transcription: 5' $\rightarrow$ 3' (Morikawa und Imamoto, 1969; Morse et al., 1969). Dies ist auch die Wanderungsrich-

tung der Ribosomen über die mRNA während der Translation. Es lag nahe, nach einer mRNAase-Aktivität zu suchen, die mit Ribosomen vergesellschaftet ist. Derartige Enzymaktivitäten wurden zweimal beschrieben (Kuwano et al., 1969; Mangiarotti und Turco, 1973). Sollte sich die Vorstellung einer ribosomenassoziierten mRNAase bestätigen lassen, muß allerdings die Frage geklärt werden, wie die Inaktivierungskompetenz der Ribosomen reguliert wird, denn zweifellos darf nicht jedes Ribosom zu jeder Zeit inaktivierend wirken können.

Beide Prozesse, sowohl die Inaktivierung als auch die Degradation, verlaufen exponentiell; beide Prozesse zeigen Kurvenverläufe, die am ehesten mit einer rein statistischen Verteilung der inaktivierenden beziehungsweise degradierenden Ereignisse erklärt werden können. Von einer vorgegebenen, homogenen mRNA-Population wird zu jedem Zeitpunkt ein konstanter Anteil inaktiviert und zu einem späteren Zeitpunkt degradiert. Geht man von der Annahme aus, daß alle mRNA-Moleküle gleich behandelt werden, vor allem, daß alle in die Translation eingehen (dies dürfte bei Bakterien der Fall sein), folgt daraus, daß für jedes Molekül zu jedem Zeitpunkt die Wahrscheinlichkeit, abgebaut zu werden, gleich groß ist.

Die Flexibilität der Regulation der Synthesekapazität hängt vermutlich wesentlich davon ab, wie rasch eine Botschaft inaktiviert wird. Hohe Flexibilität wäre dort zu erwarten, wo es sich um stoffwechselaktive Proteine, also Enzyme, Vermittler allosterischer Regulation und sonstige Regulatoren, handelt; niedrigere Flexibilität könnte die Syntheseraten der Strukturproteine kennzeichnen und wäre dort zu erwarten, wo die Stabilität einer Botschaft einen Beitrag zu einer möglichst effizienten Genexpression zu leisten hätte. Letzterer Fall wäre für eine virusspezifische mRNA zu vermuten.

Nach einer Hypothese, die von verschiedenen Arbeitsgruppen geäußert wurde (Marrs und Yanofsky, 1971; Blundell et al., 1972), könnte die Instabilität informativer RNA in erster Linie auf molekülspezifische Struk-

tureigentümlichkeiten zurückzuführen, also gleichsam eine Molekülkonstante sein.

Vermutlich befinden sich auf einer mRNA Ziele für endonucleolytische Aktivitäten von definierter Zahl und Lokalisation (Blundell et al., 1972; Blundell und Kennell, 1974). Dies könnten beispielsweise die Initiationsorte der Translation sein, die vermutlich auf der Spitze einer Schlinge liegen und daher exponiert sind (Steitz, 1969).

3.6 Stabilität der mRNA kleiner DNA-Phagen

Die Infektion von Coli-Bakterien mit fd und M13 beeinflusst den bakteriellen Stoffwechsel kaum (Hohn et al., 1971). Die Synthese M13-spezifischer RNA macht jeweils nur einen kleinen Teil der Gesamt-RNA-Synthese aus. Untersuchte man den Anteil phagenspezifischer Produkte an der Gesamtsynthese zu verschiedenen Zeiten des Infektionszyklus, stellt man fest, daß die virale mRNA etwa 30 Minuten nach der Infektion ein Maximum erreicht, dann jedoch abnimmt (Jacob et al., 1973). Im Gegensatz dazu zeigt die Synthese zweier Phagenproteine ein Plateau beziehungsweise einen weiteren Anstieg zu späteren Zeiten des Infektionszyklus. Es handelt sich dabei um das kleine Hüllprotein von fd (entsprechend dem Gen-8-Produkt) beziehungsweise das M13-spezifische Gen-5-Produkt, die beide je bis zu sieben Prozent der gesamten Proteinsynthesekapazität ausmachen können (Smilowitz et al., 1971; siehe unten, experimentellen Teil). Der Kontrast einer reduzierten Transcription und einer effizienten Translation zu späten Zeiten des Infektionszyklus läßt eine spezielle Regulation zugunsten der genannten Proteine vermuten. Ein Grund könnte die Stabilität der viralen mRNA sein.

Strukturelle Stabilität und damit hohe physikalische Halbwertszeit der M13-spezifischen RNA wurden beschrieben. Die physikalische Halbwertszeit der M13-spezifischen RNA wurde mit Hilfe eines "Pulse-Chase"- und

Hybridisationsexperiments (vgl. Abschnitt C) zu 18 - 19 Minuten bei 37 °C bestimmt (Jacob et al., 1970). Ein ähnlich hoher Wert wird auch für die ϕ X174-spezifische RNA angenommen: Die RNA ist zumindest für eine "Chase"-Periode von 10 Minuten stabil (Hayashi und Hayashi, 1970). Diese Werte liegen um ein Vielfaches höher als entsprechende Werte von E. coli (Schwartz et al., 1970).

Es bleibt zu zeigen, daß die mRNA auch funktionell stabil ist, also eine vergleichbar hohe biologische Halbwertszeit aufweist.

Für den Phagen S13, der mit ϕ X174 verwandt ist, wurde gezeigt, daß die phagenspezifische RNA nur zum Teil eine hohe funktionelle Stabilität aufweist (Puga et al., 1973). Diese Befunde sind interessant, aber nicht ohne weiteres auf fd und M13 übertragbar. S13 und ϕ X174 unterbinden nämlich kurze Zeit nach der Infektion den bakteriellen Stoffwechsel völlig. Damit werden die phagenspezifischen Produkte leichter zugänglich. Aber es läßt sich nicht feststellen, ob die Unterbindung des bakteriellen Stoffwechsels nicht die Inaktivierungs- und Degradationsprozesse an der mRNA generell verändert.

Im Fall der Infektion mit fd und M13 hingegen bleibt der bakterielle Stoffwechsel im wesentlichen intakt. Hier würde eine hohe funktionelle Stabilität der mRNA dem Phagen einen Vorteil verschaffen.

Da Voraussetzung der Bestimmung einer biologischen Halbwertszeit einer mRNA die Isolation ihres Produktes ist, bietet sich zur Zeit nur die Gen-5-mRNA an, um die Frage der funktionellen Stabilität zu prüfen. Denn nur dieses Protein läßt sich einwandfrei quantitativ isolieren (vgl. Abschnitt C).

4. Zusammenfassung der speziellen Fragestellungen

Es soll festgestellt werden, ob M13-spezifische RNA-Moleküle von Genomlänge oder länger existieren. Werden sie gefunden, schließt sich die Frage an, ob sie als Vorläufermoleküle für mRNA angesehen werden können. Die erwähnte RNAase III-Mangelmutante von *E. coli* ist für solche Untersuchungen am besten geeignet.

Es soll weiterhin festgestellt werden, ob M13-spezifische mRNA eine hohe funktionelle Stabilität im Vergleich mit colispezifischer mRNA aufweist. Es sollen experimentelle Bedingungen angewandt werden, die einen Vergleich mit Daten anderer Autoren erlauben, die an colispezifischer mRNA gearbeitet haben. In einem möglichst einheitlichen System sollen physikalische Halbwertszeit M13-spezifischer RNA und biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA miteinander verglichen werden.

Um diese Fragen zu beantworten, sind Methoden erforderlich, die es erlauben, die Neusynthese von RNA-Molekülen und deren Verbleib zu verfolgen, M13-spezifische Moleküle zu identifizieren und deren Molekulargewichte zu bestimmen. Weiter muß die aktuelle Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Protein quantitativ erfaßt werden.

Das Prinzip der benutzten Methoden wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

C. Methodische Vorbemerkungen

1.1 Das "Pulse-Chase"-Experiment

Der Begriff "Pulse-Chase"-Experiment hat sich in der Molekularbiologie als ein definierter Versuchsablauf eingebürgert; er soll daher nicht ins Deutsche übertragen werden.

Im Jahre 1959 wurde vermutlich zum ersten Mal beschrieben, wie man ein "Pulse-Chase"-Experiment durchführt und interpretiert (McQuillen et al., 1959): Colibakterien wurden 15 Sekunden lang mit $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ inkubiert ("Pulse"); die radioaktive Markierung wurde danach teils in der Ribosomenfraktion, teils in der Fraktion "löslicher" Proteine nachgewiesen. Gab man nun, anstatt die markierten Zellen unmittelbar im Anschluß an den "Pulse" aufzuarbeiten, Sulfat des stabilen Isotops und nichtradioaktives Cystin und Methionin im Überschuß hinzu und inkubierte weitere 15 Sekunden lang ("Chase"), fand sich die radioaktive Markierung größtenteils in der Fraktion der "löslichen" Proteine. Daraus war abzuleiten, daß die Colibakterien den radioaktiven Schwefel in die schwefelhaltigen Aminosäuren eingebaut hatten ("Pulse") und daß damit in der Ribosomenfraktion Polypeptidketten verlängert und schließlich ins Cytoplasma abgegeben worden waren ("Chase"). Die Ribosomen hatten sich als Proteinfabriken etabliert.

Die Charakterisierung, die McQuillen seiner Versuchsanordnung gab, kann man kaum besser formulieren:

At first sight it might appear that a growing culture of bacteria is a system so complicated as to be less useful in a study of the problems of protein synthesis than are more simplified systems. It has become apparent, however, that by choosing appropriate time scales one can emphasize one or another aspect of the total cell synthesis. When this is done it is possible to show both the rapid build up and decay of radioactivity in the nascent protein attached to the ribosomes and to show its

transfer to the soluble protein. Furthermore, it is possible to show that this process occurs in the appropriate quantity to account for most if not all of the synthesis of the soluble protein. Finally, it is possible to study separately the synthesis of protein by ribosomes and the synthesis of the ribosomes themselves even though they are intimately coupled in the intact growing cell."

Die Auswahl dieser Versuchsbedingungen hatte es ermöglicht, den Ablauf in einer komplizierten Synthesekette durchschaubar zu machen. Zudem hatten McQuillen et al. erstmals quantitative Überlegungen über Syntheseraten angestellt.

Mit Hilfe desselben Prinzips war es auch möglich, die Dynamik des Nucleinsäurestoffwechsels zu untersuchen. Während bei der DNA die Replication der genetischen Information als Voraussetzung der Zellteilung ganz im Vordergrund steht, interessiert bei der RNA neben dem Transcriptionsprozeß mindestens im gleichen Umfang der Verbleib des Moleküls. Hier gewinnt das "Pulse-Chase"-Experiment besondere Bedeutung.

Anfangs stand nur die von McQuillen benutzte Methode des "kalten Chase" zur Verfügung, das heißt der "Chase" mit nichtradioaktivem Material. So konnte beispielsweise die Kinetik des Abbaus radioaktiv markierter M13-RNA-Moleküle verfolgt werden (Jacob et al., 1970).

Diese Methode des "kalten Chase" hat den Vorteil, daß das physiologische Milieu weitgehend erhalten bleibt, denn das überschüssige Uracil wird nur in dem Umfang in die Zelle aufgenommen, in dem es zum Aufbau des Nucleotidtriphosphat-Vorrats verwendet werden kann. Eine Zeitlang kompetieren radioaktives und "kaltes" Nucleotidtriphosphat um den Einbau in die RNA; dies führt zu einer Nachinkorporation, die unter ungünstigen Versuchsbedingungen das Ergebnis beeinträchtigen kann. Ein weiterer Nachteil des "kalten Chase" ist der, daß aus dem Abbau der RNA freiwerdendes, radioaktives Material erneut eingebaut werden kann. Unter diesen Umständen wird die zu späten Zeiten des "Chase" vorhandene, eingebaute Radioaktivität zu

hoch geschätzt. In welchem Umfang Reinkorporation stattfindet und wie sehr sie die Kalkulation eines "Chase"-Experiments beeinträchtigt, kann nur mit Hilfe anderer "Chase"-Techniken kontrolliert werden.

Die Verwendung von Antibiotika als "Chaser" stellt diesbezüglich einen Fortschritt dar: Die Synthese eines bestimmten Moleküls wird zu einem geeigneten Zeitpunkt möglichst rasch, spezifisch und vollständig unterbunden, der weitere Verbleib dieses Moleküls kann nun untersucht werden.

Anfangs stand Actinomycin D zur Verfügung, das an doppelsträngige DNA bindet, und zwar über eine Wasserstoffbrückenbindung an die Base Guanin (Übersichten: Reich et al., 1967; Goldberg und Friedman, 1971; Dickerson, 1972). Der Transcriptionsprozeß wird an der Bindungsstelle gestoppt, und es entstehen unvollständige RNA-Moleküle.

1.2 Rifampicin und "Chase"

Die Rifamycine, speziell das Rifampicin (Internationale Kurzbezeichnung der WHO), sind seit dem Jahre 1969 ein wichtiges Hilfsmittel bei der Untersuchung der Synthese- und Abbaukinetik von RNA. Rifampicin bindet an die RNA-Polymerase von *E. coli* und verhindert die Initiation der Transcription; initiierte RNA-Moleküle hingegen werden vollendet (Übersichten: Wehrli und Staehelin, 1971; Riva und Silvestri, 1972).

Grundlegende Untersuchungen über die Bedingungen der Anwendung von Rifampicin haben gezeigt, daß nach Zugabe und nach Eindringen des Rifampicins in die Zelle die Inkorporation radioaktiv markierter Nucleotidvorstufen in die RNA eine Zeitlang fortgesetzt wird; ein Radioaktivitätsmaximum kennzeichnet den durchschnittlichen Terminationszeitpunkt der Population initiierteter Moleküle; danach fällt die Radioaktivitätsmenge ab, der Abstieg kennzeichnet die physikalische Halbwertszeit der instabilen Moleküle, der Restwert verbleibender Radioaktivität den Anteil der markierten stabilen Moleküle (Pato und von Meyenburg, 1970; Schwartz et al., 1970).

Die Translation naszierender mRNA (Morse et al., 1968; Miller et al., 1970) wird in vivo nicht behindert (Schwartz et al., 1970). Diese letztgenannte Eigenschaft des Rifampicins ist von besonderer Bedeutung, denn man darf davon ausgehen, daß in Gegenwart von Rifampicin neben der Translation auch andere Prozesse an der mRNA normal ablaufen, insbesondere Inaktivierung und Degradation. Im Gegensatz dazu wirkt eine Hemmung der Translation, vor allem durch Chloramphenicol, stabilisierend auf mRNA (Guthrie, 1971).

Allerdings sind Nebeneffekte des Rifampicins nicht auszuschließen. Beispielsweise scheinen bestimmte ribosomale Proteine in Gegenwart von Rifampicin instabil zu sein (Dennis, 1974). Auch längerfristige, unspezifische Effekte des Rifampicins sind nicht auszuschließen. Langfristig wirkt sich die Hemmung der Transcription auf die Synthese funktioneller Proteine und auf den Energiestoffwechsel der Zelle aus; dabei könnten Chloramphenicol-ähnliche Effekte auftreten. Andererseits ist auch die Freisetzung von Nucleasen in der absterbenden Zelle denkbar (Meier und Hofschneider, 1972).

Von mehreren Autoren wurde betont, daß die RNA-Synthese in den üblichen Laborstämmen von *E. coli*, die sensitiv für Rifampicin sind, selbst durch höhere Konzentrationen (über 100 µg/ml) nicht vollständig gehemmt wird (vgl. Schwartz et al., 1970). Hohe Rifampicin-Konzentrationen anzuwenden, wie es dann erforderlich wäre, ist schwierig, meist müssen Lösungsvermittler benutzt werden, deren Nebeneffekte nicht immer überschaubar sind. Daher ist man dazu übergegangen, von den jeweils verwendeten Mutanten Rifampicin-hypersensitive Derivate herzustellen (vgl. Schwartz et al., 1970; Gariglio und Green, 1973). Ein solches Derivat wurde auch für einen Teil der hier beschriebenen Experimente hergestellt (vgl. Abschnitt D.1).

2. Charakterisierung von in vivo synthetisierten M13-RNA-Molekülen

mRNA ist eine Mischung von Molekülen verschiedensten Informationsgehalts. Die physikochemischen Merkmale all dieser Moleküle sind sich aber weitgehend ähnlich. Daher sind einzelne mRNA-Spezies nicht ohne weiteres zu charakterisieren. Kriterien sind: Basenkomplementarität mit der jeweils codogenen DNA (Hybridisation), Molekulargewicht und biologische Funktion (qualitativ: Produktanalyse des synthetisierten Proteins; quantitativ: Synthesekapazität, die für das Protein zur Verfügung steht).

2.1 Hybridisation

Die radioaktiv markierte, M13-spezifische RNA macht in der M13-infizierten Zelle günstigstenfalls 5 - 7 Prozent der Gesamt-RNA aus (unter Versuchsbedingungen, die die Markierung von mRNA begünstigen: Jacob et al., 1973) und wird von einem hohen Überschuß an ribosomaler RNA und zellulärer mRNA überlagert. Dies schließt eine Analyse der in vivo synthetisierten M13-spezifischen mRNA mit einfachen Mitteln aus.

Deshalb benutzt man gewöhnlich die Hybridisationstechnik (Übersicht: Gillespie, 1968). Hybridisation bedeutet Basenpaarung zwischen dem codogenen Strang der DNA und der basenkomplementären RNA. Die Hybridisationsreaktion verläuft hochspezifisch. Unspezifische Paarungen machen bei einwandfreier Technik weniger als zehntel Promille aus (Gillespie und Spiegelman, 1965).

In der Praxis geht man meist so vor, daß ein Gemisch verschiedenster RNA-Moleküle daraufhin untersucht wird, welcher Anteil mit einem vorgegebenen DNA-Strang Basenpaarung eingehen kann. Ist M13-Minus-Strang-DNA (bzw. denaturierte M13-RF-DNA) vorgegeben, repräsentiert der Anteil hybridisierter RNA den Anteil M13-spezifischer Moleküle des RNA-Gemischs.

2.2 Fraktionierung und Hybridisation

In Verbindung mit der Hybridisation ergibt die Fraktionierung eine weitere wichtige Aussage über M13-spezifische RNA-Moleküle, nämlich über die Molekulargewichtsverteilung. Die Gesamt-RNA einer infizierten Coli-Zelle wird durch Gelelektrophorese oder Bandsedimentation im Saccharose-Gradienten fraktioniert und fraktionenweise hybridisiert. Vor allem die Gelelektrophorese kann relativ leicht auch in Gegenwart von denaturierenden Agentien durchgeführt werden, so daß die Frage möglicher Aggregate der RNA geprüft werden kann. Denaturierendes Agens in Gelen ist meist (Dimethyl-)Formamid (Staynov et al., 1972; Duesberg und Vogt, 1973).

Wesentlich bei der fraktionierten Hybridisation ist, daß in allen Fraktionen optimale Hybridisationsbedingungen herrschen; das bedeutet im wesentlichen ein möglichst niedriges RNA-DNA-Verhältnis, damit annähernd quantitative Hybridisation gewährleistet ist (Übersicht: Kennell, 1971).

Die Verwendung geeigneter Bakterien-Mutanten und von Rifampicin, die Reinigung, Fraktionierung und Hybridisation der M13-spezifischen RNA ergeben ein experimentelles System, aus dem sich Aussagen über Transcriptionseinheiten, Synthesekinetik und Abbaukinetik M13-spezifischer RNA ableiten lassen. Die Hybridisation erlaubt jedoch keine Aussage über die biologische Aktivität von mRNA-Molekülen.

Bei dem inaktivierenden, endonucleolytischen Schnitt wird möglicherweise nur eine kurze Nucleotidsequenz von der mRNA abgespalten. Diesen Schnitt zu lokalisieren, würde präzisere Techniken erfordern als die Fraktionierung durch Gelelektrophorese.

Man müßte, um den Prozeß der Inaktivierung untersuchen zu können, über eine homogene, intakte mRNA-Population verfügen. Derartige RNA steht zur Zeit nur als Virus-RNA zur Verfügung, die bei einigen Viren mRNA-Charakter hat. Das inaktivierende Enzym müßte gereinigt vorliegen, die

Inaktivierung müßte in vitro durchgeführt werden können, und die Längenmessung müßte elektronenmikroskopisch erfolgen. Einige der genannten Voraussetzungen sind zur Zeit nicht erfüllbar.

3. M13-Gen-5-mRNA: Synthesekapazität und biologische Halbwertszeit

Aus Gründen, die in vorangehenden Abschnitten erläutert wurden, existiert kein anderes Kriterium für die biologische Aktivität einer mRNA als die Synthesekapazität für das codierte Protein.

Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß zum jeweiligen Zeitpunkt der Messung alle biologisch aktiven mRNA-Moleküle translatiert werden. Diese Messung würde verfälscht, wenn ein Teil der synthetisierten, biologisch aktiven mRNA-Moleküle zunächst in einen Informationspool eingingen, aus dem sie in wechselnden Mengen zur Translation entlassen würden. Bisher gibt es keine Hinweise für einen Informationspool in Bakterien.

Will man die biologische Aktivität einer mRNA messen beziehungsweise ein Maß für die Menge biologisch aktiver mRNA-Moleküle haben, muß man in der Lage sein, das codierte Protein quantitativ im analytischen Maßstab zu isolieren. Dann kann die Synthesekapazität für das Protein gemessen werden als Menge der in der Zeiteinheit in das Protein inkorporierten Radioaktivität. Es läßt sich sowohl die Zunahme der Synthesekapazität für ein bestimmtes phagenspezifisches Protein mit zunehmender Zeit nach Infektion als auch die Abnahme der Synthesekapazität nach Zugabe von Rifampicin messen.

M13-spezifische Proteine werden von einem hohen Überschuß an Coli-Proteinen überlagert. In UV-bestrahlten Zellen, in denen die Synthese und Markierung von Coli-Proteinen stark zurückgedrängt ist, konnten drei von vermutlich acht phagenspezifischen Proteinen in vivo nachgewiesen werden; es handelte sich um die Coat-Proteine, die Produkte der Gene 3 und 8, und das Gen-5-Protein von M13 (Henry und Pratt, 1969).

Ein weiteres, viertes Protein, das Gen-2-Produkt, taucht in UV-bestrahlten, infizierten Zellen in ungewöhnlich großen Mengen auf, wenn bei 42 °C markiert wird (Lin und Pratt, 1974). Bei dieser unphysiologischen Tempera-

tur wird die Synthese dieses Proteins aus unbekannten Gründen stark stimuliert.

Von den genannten Proteinen sind nur drei leicht zugänglich, nämlich die Coat-Proteine und das Gen-5-Protein. Die Coat-Proteine lassen sich allerdings nicht ohne weiteres quantitativ bestimmen, obwohl man sie im reifen Phagen leicht findet, weil sie kontinuierlich mit den freigesetzten Phagen aus der Zelle entlassen werden.

In dieser Situation bietet sich nur das Gen-5-Protein von M13 an, weil es als funktionelles Protein in der Zelle verbleibt und durch Affinitätschromatographie leicht gereinigt werden kann. Dadurch wird auch seine quantitative Bestimmung möglich (Oey und Knippers, 1972; Alberts et al., 1972). Das Protein wurde inzwischen sequenziert (Nakashima et al., 1974; Cuypers et al., 1974).

Die biologische Halbwertszeit der Gen-5-mRNA ergibt sich aus der Abnahme der Synthesekapazität in Gegenwart von Rifampicin.

D. Methodische Vorarbeiten zu den Experimenten

1. Isolation der Mutante E. coli K12 AB301 NTG-Rif^S

AB301 NTG-Rif^S ist ein Derivat von E. coli K12 AB301 RNAase⁻₁₉ (F⁺, lambda⁺, met⁻, RNAase I⁻), ursprünglich von R. Gesteland als RNAase I-Mangelmutante isoliert und A19 genannt (Gesteland, 1966).

AB301 NTG-Rif^S zeichnet sich im wesentlichen durch Hypersensitivität für Rifampicin aus. Die Notwendigkeit für die Isolation dieses Derivats wurde in Abschnitt C.1 begründet.

1.1 Nitrosoguanidin-Mutagenese und Ampicillin-Selektion

Die Isolation des Derivats nach der Replica-Plating-Methode folgte im wesentlichen einem in der Literatur beschriebenen Verfahren (Schwartz et al., 1970).

Eine Übernachtskultur von AB301 in dem reichen "Antibiotic Medium 3" (Difco) mit Zusatz von 0.5 % Glucose (M3G) wurde im Verhältnis 1:500 in dasselbe Medium überimpft und bei 37 °C Wasserbadtemperatur belüftet, bis ein Bakterientiter von 2×10^8 /ml erreicht war. Dann wurde Nitrosoguanidin ad 30 µg/ml hinzugegeben (1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidin, Serva). Nach 30 Minuten Einwirkungsdauer bei 37 °C ohne Belüftung wurden die Zellen abzentrifugiert, zweimal in Minimalsalz-Glucose-Medium (MMG) unter Zusatz von 15 Prozent w/v Saccharose gewaschen und in 0.05 Volumina MMG resuspendiert. (MMG enthält in 1 Liter wässriger Lösung: 5 g Ammoniumchlorid, 1 g Ammoniumnitrat, 2 g Natriumsulfat wasserfrei, 3 g Dikaliumphosphat wasserfrei, 1 g Monokaliumphosphat, 0.1 g Magnesiumsulfat, 10 g Glucose. pH ist 7.0.) Die resuspendierten Zellen wurden im Verhältnis 1:1000 in MMG mit Zusatz von 0.2 % Caseinhydrolysat (3/4 vitaminfrei, 1/4 technisch) überimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Dieser Schritt bewirkte die Reduktion des Anteils erheblich defekter Zellen.

Die Rifampicin-Ampicillin-Selektion wurde in M3G durchgeführt; die MMG-Übernachtskultur wurde 1:100 überimpft.

Bei einem Titer von 5×10^8 /ml wurden 0.5 µg/ml Rifampicin (Grünenthal) zugegeben. Die Zellen, die von dieser Rifampicin-Konzentration nicht in ihrem Wachstum gehemmt waren, wurden nun sieben Minuten später durch Zugabe von Ampicillin (Bayer) ad 60 µg/ml getötet. Das Ampicillin wirkte 60 Minuten lang ein, um alle noch wachsenden Zellen erfassen zu können, dann wurden die Bakterien sedimentiert und gewaschen. Etwa 0.25 Prozent der Zellen überstanden die Ampicillin-Selektion, wie ein Vergleich der Zellzahl im Phasenkontrast-Mikroskop und der Zahl der kolonienbildenden Keime ergab.

Sie wurden auf M3-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C bebrütet. Die so entstandenen "Masterplatten" wurden mit Hilfe eines mit sterilem Samt überzogenen Stempels auf M3-Platten ("Replicaplaten") mit und ohne 1 µg/ml Rifampicin überimpft.

Von 1200 durchgesehenen Kolonien wuchsen 10 unter Einwirkung von 1 µg/ml Rifampicin nicht. Eine dieser Kolonien wurde in M3G überimpft und ein zweites Mal dem Rifampicin-Ampicillin-Selektionierungsprozeß unterzogen. Hier zeigte noch eine von acht verdächtigen Kolonien die gewünschten Eigenschaften mit der notwendigen Stabilität, das Derivat AB301 NTG-Rif^S. Bis heute hat sich kein Anhaltspunkt für das Verschwinden der Hypersensitivität gegenüber Rifampicin ergeben.

1.2 Eigenschaften von AB301 NTG-Rif^S

AB301 NTG-Rif^S wächst in MMG nur bei Zusatz von Methionin und Histidin; Außerdem ist die Zelle M13-sensitiv und lambda-resistent. Daraus ergeben sich die Eigenschaften F⁺, met⁻, his⁻, lambda⁺. Die Eigenschaften Hfr und RNAase I⁻ wurden nicht untersucht.

In wesentlichen genetischen Markern scheinen sich Derivat und Ausgangsstamm ähnlich zu sein. Dasselbe gilt für die wichtigsten Wachstumseigenschaften: Die Generationszeit beträgt bei dem Derivat wie bei dem Ausgangsstamm unter den Standardbedingungen, in H-Medium bei

30 °C, 60 Minuten.

Die Zellen des Derivats sind allerdings kleiner. Wachsen sie in reichen Medien bei 37 °C, zeigen sie Neigung zur Verklumpung und zur Ausbildung von Strepto-Formen, beides jedoch nicht in definierten, synthetischen Medien bei 30 °C. Die Zellen bilden 2 - 3 Pili aus (elektronenmikroskopische Untersuchung mit freundlicher Unterstützung durch Frau Dr. A. Jacobson).

Die Sensitivität gegenüber Rifampicin ist deutlich erhöht. Von 10^6 Kolonienbildnern einer Kultur in H-Medium wachsen auf M3-Agarplatten mit Zusatz von definierten Mengen Rifampicin:

	AB301	AB301 NTG-Rif ^S
2 µg/ml	10^6	20
10 µg/ml	40 000	1

Über die genetische Grundlage der Rifampicin-Hypersensitivität lassen sich nur Vermutungen anstellen. Im Prinzip bestimmen zwei Parameter den Grad der Wirksamkeit von Antibiotika: die Permeabilität und die Fähigkeit oder Unfähigkeit einer Zelle zur Inaktivierung.

Eine Beobachtung zeigt, daß eine Parallelität besteht zwischen der Sensitivität verschiedener Coli-Stämme gegenüber Antibiotika (nicht Rifampicin) und gegenüber Detergentien. Dies läßt darauf schließen, daß gerade bei Laborstämmen Defekte der Bakterienwand (oder -membran) als Grundlage der Sensitivität eine ebenso bedeutende Rolle spielen wie beispielsweise Resistenzfaktoren (Ennis, 1971).

Dafür spricht ebenfalls, daß in vitro bereits 0.2 µg/ml Rifampicin die RNA-Polymerase hemmen, in vivo aber bis zu 400 µg/ml angewandt werden müssen.

Bei Rifampicin scheint die Permeabilität ein bedeutender Faktor für die Wirksamkeit zu sein.

Auf jeden Fall muß unterschieden werden zwischen der Rifampicin-Resistenz und der Rifampicin-Hypersensitivität. Im einen Fall handelt es sich um eine genetisch determinierte Veränderung des Angriffsortes für Rifampicin, einer Untereinheit der RNA-Polymerase (Tocchini-Valentini et al., 1968; Ezekiel und Hutchins, 1968; Rabussay und Zillig, 1969; Heil und Zillig, 1970); im anderen Fall um genetisch nur schwer bestimmbare Komponenten wie Zellwand- und Zellmembransynthese.

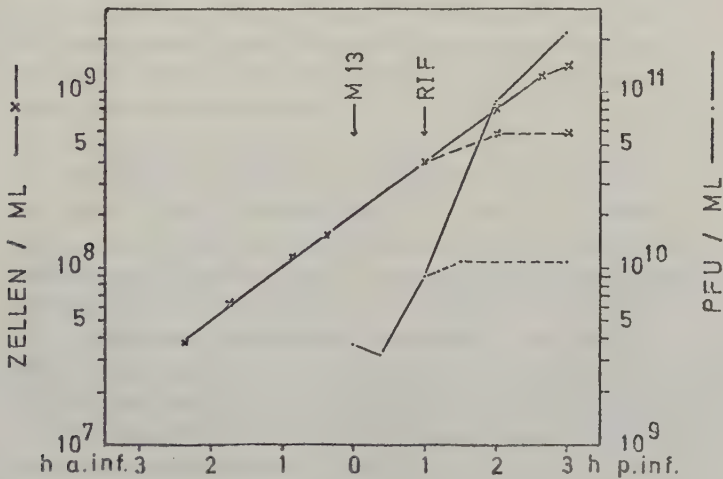


Abb. 1: Kultur von AB301 NTG-Rif^S in modifiziertem H-Medium (vgl. Abschnitt G) bei 30 °C. Bei einem Zelltitert von 2×10^8 /ml Infektion mit M13 Wildtyp (Infektionsmultiplizität 20). Teilung der Kultur. 60 Minuten nach Infektion Zugabe von Rifampicin ad $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ zu einem Teil der Kultur.

Bei Zugabe von 10 μ g/ml Rifampicin kommt die Zellvermehrung zum Stehen. Zugabe von Rifampicin innerhalb von 25 Minuten nach M13-Infektion unterbindet die Ausschleusung reifer Phagen vollständig; Zugabe 60 Minuten nach Infektion bringt die Phagenvermehrung innerhalb von 10 Minuten zum Erliegen: Abbildung 1. Dies überrascht nicht in Anbetracht der in Abschnitt B erläuterten Daten; wesentlich ist nur die Wirksamkeit ungewöhnlich kleiner Rifampicin-Konzentrationen.

2. Isolation von M13-RF-DNA

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden große Mengen von M13-RF-DNA zur Hybridisation benötigt. Um die Isolation solcher DNA zu erleichtern, wurde nach Wegen gesucht, die bisher benutzten Verfahren in wesentlichen Punkten zu vereinfachen.

Das bisherige Standardverfahren bestand aus: einer Deproteinisation des Bakterienlysats mit Phenol und der anschließenden Fraktionierung der Nucleinsäurepräparation durch Zonalzentrifugation über einen alkalischen Saccharose-Gradienten (Jaenisch et al., 1969).

Der Hauptnachteil dieses Verfahrens ist die Art der Gewinnung der Nucleinsäure. Die Phenolisierung des rohen Bakterienlysats führt zu einer Gesamtpräparation der Nucleinsäure mit hohem Überschuß an zellspezifischem Material. Dadurch wird die Effizienz jedes weiteren Reinigungsschrittes vermindert.

Das im folgenden erläuterte Verfahren benutzt:

1. eine Lysetechnik, bei der ein großer Teil der zellspezifischen, chromosomalen DNA (im analytischen Maßstab 99 % und mehr) von vornherein eliminiert werden, während der größte Teil der phagenspezifischen DNA gewonnen wird;
2. eine Molekülsieb-Chromatographie, die weitere chromosomale DNA, sowie RNA, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate abtrennt;
3. abschließend eine Ultrazentrifugation zur vollständigen Reinigung der RF-DNA.

Das Prinzip der Lysetechnik wurde der Literatur entnommen (Godson und Vapnek, 1973; Sugiura et al., 1969). Die Modifikation dieser Lysetechnik zur bequemen Aufarbeitung sehr großer Zellmengen, die Chromatographie und das Prinzip von Gradienten, die zur endgültigen Reinigung von RF-DNA geeignet sind, werden im folgenden beschrieben. Die weitere Reinigung kann einen alkalischen Gradienten umgehen, die Moleküle können im Prinzip also nativ isoliert werden. Die Isolationsmethode dürfte für circuläre DNA allgemein anwendbar sein.

2.1 Isolation einer tritiierten M13-RF-DNA als Marker

Fünfundzwanzig Milliliter H-Medium (vgl. Abschnitt G) werden mit *E. coli* K12 AB301 beimpft; bei 37 °C Wasserbadtemperatur und mäßiger Belüftung werden die Zellen bis zu einem Titer von 2×10^8 /ml kultiviert, dann mit einer Infektionsmultiplizität von 20 mit M13 Wildtyp infiziert und von 15 bis 60 Minuten nach Infektion mit 6-³H-Thymidin (25 Ci/mM; 50 µCi/ml) markiert. Das Zellpellet wird in 2 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 10 % w/v Saccharose resuspendiert, 0.2 ml einer frischen Lysozymlösung von 10 mg/ml 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 und 0.4 ml einer 0.5-molaren EDTA-Lösung (pH 8.2) werden hinzugefügt, dann wird die Zellsuspension 45 Minuten lang bei Raumtemperatur stehengelassen.

War die Lysozymbehandlung ausreichend, führt die Zugabe von 0.2 ml einer 20 %igen SDS-Lösung schlagartig zur vollständigen Lyse. Es ist unzweckmäßig, eine möglicherweise unvollständige Lyse durch Rühren oder ähnliche Manipulationen vervollständigen zu wollen, da dies unweigerlich zum Entstehen von Coli-DNA-Fragmenten führt.

Das Lysat läßt man einige Stunden bei Null Grad stehen, dann wird es einige Minuten bei 30 000 g und 2 °C zentrifugiert. Die Zellwandfraktion und die chromosomale DNA pelletieren, während RF-DNA, RNA und Proteine (neben Lipiden und Kohlenhydraten) in Lösung bleiben. Zugabe von Kochsalz ad 1 M/l führt zur Ausfällung eines Großteils von RNA und Proteinen. Die Ausfällung kann durch Zentrifugieren vervollständigt werden. Es entsteht ein transparenter Überstand, in dem sich die RF-DNA befindet. Man kann die RF-DNA durch Zugabe von 3 Volumina absoluten Alkohols in der Kälte (- 20 °C) und durch Zentrifugation in der Kälte bei 10 000 g innerhalb von 45 Minuten präzipitieren. Es ist zweckmäßig, das RF-Präzipitat nicht zu trocknen; es genügt, die Alkoholphase vorsichtig abzugießen und das Zentrifugationsröhrchen zu drainieren. Untrocknete Nucleinsäure löst sich leichter in Puffer, die Beimengung von Aethanol stört nicht.

Die RF-DNA-Lösung ist noch mit Spuren von Fragmenten chromosomaler DNA, RNA und Proteinen kontaminiert, die angesichts des geringen Anteils von RF an der Gesamtmasse einer Zelle den RF noch beträchtlich überlagern. Die weitere Reinigung wird durch einen alkalischen Saccharose-Gradienten erzielt (Abbildung 2).

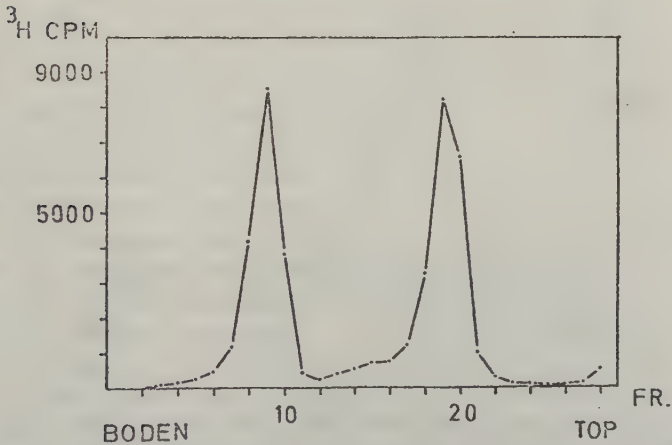


Abb. 2: Reinigung einer tritiierten M13-RF-DNA durch Zentrifugation über einen alkalischen Saccharose-Gradienten. Das Pellet der Alkoholfällung (siehe Text) wird in 1 ml Puffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 5 mM EDTA- Na_2) gelöst und durch Zusatz von 0.5 ml 0.1 M NaOH alkalisiert. Aufschichten auf einen 37 ml-Gradienten alkalischer Saccharose (Jaenisch et al., 1969). Zentrifugation im Beckman SW 27 Rotor bei 4 °C und 25 000 rpm für 13 h. Abtropfen vom Boden, es entstehen 28 Fraktionen zu 20 Tropfen. 10 μl jeder Fraktion werden mit 50 μg kalter Carrier-DNA mit TCA gefällt.

Der bodennahe Peak repräsentiert M13-RF I-DNA, der andere Peak Coli-DNA, die unter den pH-Bedingungen vollständig denaturiert und deshalb mit niedrigem s-Wert sedimentiert.

Die Fraktionen 7 bis 13 werden vereinigt, durch Zusatz von 1 n HCl wird die alkalische Saccharose neutralisiert, dann wird die DNA mit Alkohol präzipitiert. Die RF-DNA kann nun durch Zentrifugation über einen neutralen Niedrigsalz-Saccharose-Gradienten weiter gereinigt werden (Abbildung 3).

Werden hohe Ansprüche an die Reinheit des Materials gestellt, sollte sich noch ein neutraler Saccharose-Gradient anschließen (Abbildung 3).

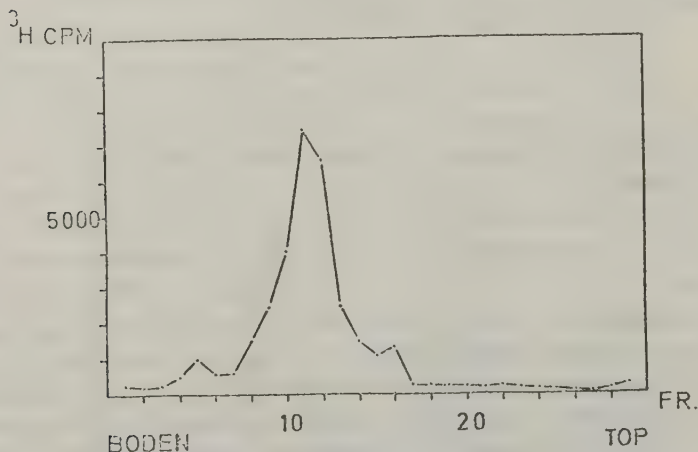


Abb. 3: Zweiter Schritt der Reinigung einer tritierten M13-RF-DNA über einen neutralen Niedrigsalz-Saccharose-Gradienten. Das Pellet der Alkohol-fällung des DNA-Pools vom alkalischen Gradienten (vgl. Abb. 2) wird in 1 ml Puffer (10 mM Natriumphosphat, pH 7.2, 5 mM EDTA- Na_2) gelöst. Auf-schichten auf einen 35.6 ml-Gradienten 20 bis 5 %iger Saccharose (über einem 1.5 ml-Bodenkissen 60 %iger Saccharose (in 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA- Na_2)). Zentrifugation im Beckman SW 27 Rotor bei 4 °C und 25 000 rpm für 17 h. Abtropfen vom Boden. Es entstehen 29 Frak-tionen zu 20 Tropfen. 10 μ l jeder Fraktion werden mit 50 μ g kalter Car-rier-DNA mit TCA gefällt.

Der große Peak repräsentiert M13-RF I-DNA, die Schulter zum Top hin M13-RF II-DNA, der Peak zum Boden hin kontaminierende Coli-DNA.

2.2 Großkultur von 200 Litern M13-infizierter Bakterien

Verwendet wurde ein 200-Liter-Fermenter (LUWA, Zürich). Es wurde ein modifiziertes H-Medium benutzt. H-Medium ist verhältnismäßig arm; Wachstum in armen Medien begünstigt die Lyse, da Bakterien in reichen Medien dicke Zellwände auszubilden pflegen.

Das Medium enthielt in 200 Litern: 2420 g Tris, 400 g KCl, 400 g NH_4Cl , 100 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 g Na_2SO_4 , 2000 g Glucose, 1600 g technisches Caseinhydrolysat, 2 g Uracil und 0.4 g Desoxyadenosin. Der pH wurde mit 1200 ml konzentrierter Salzsäure eingestellt, er befand sich nach dem Autoklavieren bei 7.6 und sank während der Bakterienzucht auf 7.0.

Angeimpft wurde mit 4 Litern einer Kultur von E. coli K12 AB301 in M3-Medium (Titer: $2.4 \times 10^9/\text{ml}$). Nach 2 Stunden und 10 Minuten Kultur bei 37°C und mittlerer Belüftung war ein Titer von $1.5 \times 10^8/\text{ml}$ erreicht. Nun wurden 2.4 Liter eines M13-Kultur-Überstandes mit dem Titer von 3×10^{11} pfu/ml hinzugegeben, die Infektionsmultiplizität betrug somit etwa 20. 90 Minuten nach Infektion wurde die Kultur gestoppt, indem sie auf Eis abgelassen wurde. Der Zelltiter betrug etwa $4 \times 10^8/\text{ml}$, der Phagentiter 7×10^{10} pfu/ml. Die Zentrifugation der Kultur durch eine Padberg-Durchlaufzentrifuge ergab ein Zellpellet von etwa 300 g Feuchtgewicht.

Die Zellen wurden in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 10 % w/v Saccharose resuspendiert, das Gesamtvolumen der Suspension betrug 1800 ml. Zwölfmal 150 ml Suspension wurden auf zwölf 250-ml-MSE-Zentrifugenbecher verteilt. Zugefügt wurden je 15 ml einer frischen Lysozymlösung (EC 3.2.1.17) von 10 mg/ml 0.25 M Tris-HCl pH 8.0 und 30 ml einer 0.5-molaren EDTA-Lösung (pH 8.2), inkubiert wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur. Gibt man nun 15 ml einer frischen, 20 prozentigen SDS-Lösung hinzu, wird man kaum eine vollständige Lyse erzielen; die Lyse sollte auch in keiner Weise forciert werden. Erst nach Stehenlassen des Lysats bei 0°C über Nacht wird die Zentrifugation in einer MSE-HS18 bei 2°C (cave Einfrieren!) 3 Stunden lang bei 23 000 g durchgeführt.

Der Überstand wird vorsichtig abgekippt. Wesentlich ist, daß nichts von dem gelatinösen Pellet, hauptsächlich bestehend aus Zellwand und chromosomaler DNA, in die Überstands-Fraktion gerät. In den Überstand wird Kochsalz ad 1 M/l eingeührt und vollständig gelöst. Das Lysat kann in dieser Form aufbewahrt werden, günstig ist eine Temperatur zwischen - 5 und - 10 °C.

Die Kochsalzfällung wird erst unmittelbar vor dem Auftragen des Materials auf die Säule durch kurzes Zentrifugieren bei 23 000 g und 0 °C komplettiert.

Der Überstand der Kochsalz-Fällung enthält doppelsträngige DNA, aber auch RNA, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. War die Lyse ausreichend, hat der Überstand eine O.D.₂₆₀¹⁰ von 100 bis 120 pro ml, was etwa 3 - 4 mg/ml Nucleinsäure entspricht.

2.3 Säulenchromatographie

Eine Agarose-Säule fungiert als Molekülsieb: Gelierte Agarose definierter Konzentration wird in Partikel definierter Größe zerkleinert und stellt ein dreidimensionales Sieb mit großen und kleinen Poren dar. Sehr große Moleküle beziehungsweise Partikel wandern durch die großen Poren zwischen den Agarose-Partikeln und nehmen dabei den kürzesten Weg durch die Säule; sie erscheinen als erste im Eluat, im sogenannten Ausschlußvolumen (V_0). Kleinere Moleküle beziehungsweise Partikel treten mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit, die von der Form und Größe abhängt, in die Poren der Agarose-Partikel ein; ihr Weg wird um so länger, je kleiner sie sind. Entsprechend früher oder später erscheinen sie im Eluat und werden somit fraktioniert. Wird lediglich die Abtrennung des im Ausschlußvolumen erscheinenden großen Materials von niedermolekularem Material gewünscht, ist die Kapazität einer derartigen Säule sehr groß. (Für weitergehende Einzelheiten siehe die Übersicht: Fischer, 1971.) Der besondere Vorteil der Agarose ist, daß sie Makromoleküle von einigen Millionen Daltons Molekulargewicht fraktioniert. Verwendet wurde Sepharose 2B (Pharmacia), die Dextranpolymere von mehr als 10^7 d ausschließt und zwi-

schen 10^7 und 10^5 fraktioniert, und Sepharose 4B, die Dextranpolymere von mehr als 2×10^6 d ausschließt und zwischen 2×10^6 und 10^4 fraktioniert. Der Fraktionierungsbereich hängt nicht nur vom Molekulargewicht ab, sondern variiert in Abhängigkeit von der Molekülkonfiguration. Dextranpolymere sind repräsentativ für lineare Makromoleküle. Wie sich Nucleinsäure-Moleküle auf der Säule verhalten würden, war anfangs unklar, da dazu keine einschlägigen Daten vorlagen. Insbesondere war von Interesse, ob sich mit einer Agarose-Säule nicht nur eine Trennung zwischen DNA und den restlichen Komponenten des Überstands der Kochsalz-Fällung erzielen lassen würde, sondern auch eine Trennung linearer Coli-DNA-Fragmente und circularer M13-RF-DNA.

Konstruktion der Säule und Bedingungen der Chromatographie: Verwendet wurden Säulen von 5 cm Durchmesser ($F = 19.6 \text{ cm}^2$) und 100 beziehungsweise 60 cm Länge (Pharmacia). Die längere Säule wurde etwa 75 cm hoch mit Sepharose 2B gefüllt, die kleinere Säule etwa 30 cm hoch mit Sepharose 4B. Beide Säulen wurden so verbunden, daß das aufgeschichtete Material zunächst von oben nach unten die Sepharose 2B passierte und dann von unten nach oben die Sepharose 4B. Die aufeinanderfolgenden, unterschiedlichen Sepharosetypen ergaben, wie verschiedene Versuche zeigten, die beste Trennung zwischen DNA und RNA, Proteinen und niedermolekularen Substanzen. Das gesamte Säulenmatrixvolumen betrug etwa 2060 ml. Die Säule wurde mit einem Puffer konstanter Zusammensetzung gespeist. Das Eluat wurde durch einen UV-Recorder (Uvicord I) in einen Fraktionssammler geleitet. Auf eine Pumpe wurde verzichtet, ein hydrostatischer Druck von etwa 1.5 m Wassersäule war ausreichend.

Der Eluationspuffer enthielt 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA- Na_2 , 0.95 M NaCl, 0.02 % NaN_3 und eine Spur SDS und entsprach damit weitgehend (bis auf die Saccharose-Beimengung) der Zusammensetzung des Überstands der Kochsalz-Fällung. Die Elutionsgeschwindigkeit betrug konstant etwa 60 ml/h. Die Wartungsansprüche der Säule waren gering, zehn bis zwölf Säulenläufe konnten durch-

geführt werden, ehe das Säulenmaterial regeneriert und die Säulen neu gepackt werden mußten.

Das Aufschichten des Materials gelang leicht, da der Überstand der Kochsalz-Fällung 10 % w/v Saccharose enthielt. Das Material konnte durch einen Schlauch unmittelbar auf die Säulenmatrix geschichtet werden, es verdrängte den über der Säule stehenden Puffer auf Grund der höheren Dichte.

Beschreibung eines präparativen Säulenlaufs: Aufgeschichtet wurden etwa 10 000 O.D.₂₆₀ des Materials der Kochsalz-Fällung in 100 ml, was etwa 300 - 400 mg Nucleinsäure entspricht.

Das Ausschlußvolumen erscheint bei 580 ml (entsprechend 28 % des Säulenmatrixvolumens). Zwischen 580 und 1100 ml wird nur DNA eluiert. RNA erscheint erst bei 1500 ml. Proteine, Lipide und Kohlenhydrate werden noch wesentlich später eluiert (Abbildung 4). Es zeigt sich, daß durch die hohe Salzkonzentration des Elutionspuffers

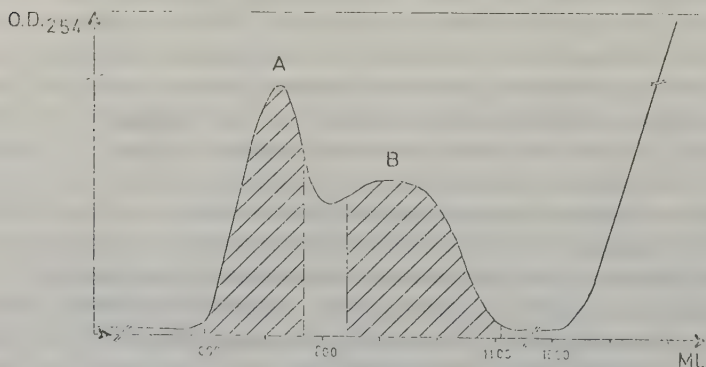


Abb. 4: Chromatographische Vorreinigung der M13-RF-DNA über eine Sepharose-Säule. Gesamt-Säulenmatrixvolumen etwa 2060 ml. Das Ausschlußvolumen erscheint bei 580 ml. Peak und Schulter zwischen 580 und 1100 ml enthalten nur DNA. RNA erscheint erst bei 1500 ml, Proteine noch später. A und B repräsentieren zwei Fraktionen des frühen Eluats mit unterschiedlicher Zusammensetzung (vgl. Abbildung 5). Einzelheiten im Text.

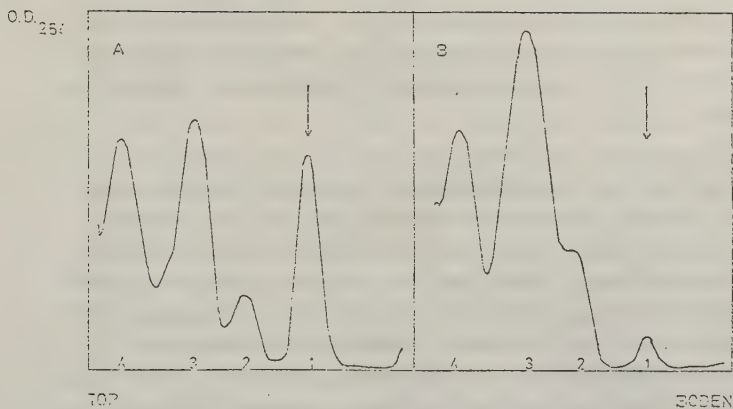


Abb. 5: Ultrazentrifugation der konzentrierten Säulen-Eluat-Fractionen A und B (vgl. Abbildung 4) über alkalische Saccharose-Gradienten (Jae-nisch et al., 1969). Bedingungen wie in der Legende zu Abb. 2. Aufge-schichtet wurden je 15 O.D.¹⁰₂₆₀, entsprechend etwa 0.75 mg DNA, und tri-tiierte M13-RF-Marker-DNA. Zapfen des Gradienten vom Boden, es entstehen 28 Fractionen zu 20 Tropfen. Messung des Profils der optischen Dichte beim Zapfen mit Hilfe eines UV-Recorder (Uvicord 1). Bestimmung des Ra-dioaktivitätsprofils durch TCA-Fällung von 50 µl jeder Fraction mit 50 µg kalter Carrier-DNA.

Peak 1: M13-RF-DNA. Hier findet sich die M13-RF-Marker-DNA (nicht ge-zeigt). In dieser Position kann M13-RF-DNA elektronenmikroskopisch nach-gewiesen werden (vgl. Abbildung 6).

Peak 2: Coli-DNA, hat im neutralen Gradienten hohe Sedimentationsge-schwindigkeit, wird im alkalischen Gradienten jedoch zu einzelsträngi-ger DNA denaturiert und sedimentiert deshalb erheblich langsamer als die M13-RF-DNA, die unter denselben Bedingungen stark beschleunigt sedi-mentiert.

Peak 3: Zum Teil M13-DNA (virale DNA und denaturierte RF-DNA), vermischt mit kleineren Fragmenten von Coli-DNA.

Peak 4: Fragmentierte Coli-DNA von weniger als 10 s.

Ein Vergleich der Profile A und B zeigt, daß M13-RF-DNA zum größten Teil in der Säulen-Eluat-Fraction A erscheint. Hingegen ist der Anteil an Coli-DNA in der Eluat-Fraction B größer. Bei der Bewertung der Profile ist zu beachten, daß der benutzte Schreiber logarithmisch verzerrt. Sehr kleine Peaks erscheinen überproportional, sehr große unterproportional.

Nucleinsäuren und Proteine dissoziiert werden und daß die guten Trenneigenschaften der Säule eine ausreichende Vorreinigung der DNA gewährleisten. Auf die Verwendung von Phenol kann während der frühen Aufarbeitungsschritte, wo mit großen Volumina gearbeitet werden muß, verzichtet werden.

Von besonderem Interesse ist, daß auch die DNA nicht einheitlich im Ausschlußvolumen erscheint, sondern daß eine gewisse Auftrennung stattfindet. Wie die Analyse der Säulenfraktionen A und B auf alkalischen Saccharose-Gradienten zeigt (Abbildung 5), enthält Peak A den größten Teil der circulären M13-RF-DNA, Peak B hingegen den größten Teil der Coli-DNA. In Profil A von Abbildung 5 macht M13-RF-DNA etwa 150 µg, entsprechend 20 % der aufgeschichteten Menge, aus. Daneben schleppen beide Fraktionen, A und B, erhebliche Mengen kleinerer DNA-Fragmente mit. Sieht man von diesen kleineren Fragmenten ab, die einfach mitgerissen werden und sich atypisch verhalten, kann man annehmen, daß auf der Agarose-Säule bei hoher Salzkonzentration nicht nur eine Trennung nach Molekulargewicht, sondern auch nach Molekülkonformation stattfindet. Circuläre DNA-Moleküle haben die größte relative Mobilität auf solchen Säulen. Es ist wahrscheinlich, daß durch eine Verlängerung der Trennstrecke eine verbesserte Trennung der Säulenfraktionen A und B erzielt werden kann.

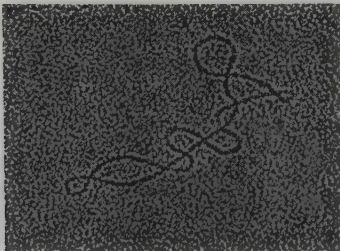


Abb. 6: M13-RF-DNA. Elektronenmikroskopische Aufnahme aus Peak 1 (vgl. Abbildung 5). (Elektronenmikroskopische Präparation und Aufnahme mit freundlicher Unterstützung durch Frau Dr. A. Jacobson.)

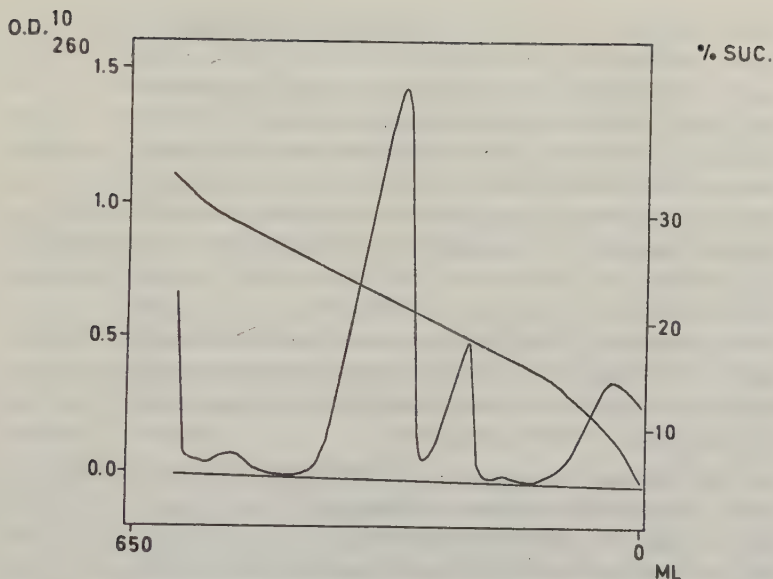


Abb. 7: Präparative Reinigung von M13-RF-DNA. Zonalzentrifugation der konzentrierten Säuleneluatfraktionen A von mehreren Säulenläufen (vgl. Abbildung 4) über einen neutralen Hochsalz-Saccharose-Gradienten. Ein 650 ml-Gradient 10 bis 30 %iger Saccharose (in 50 mM Tris-HCl pH 7.8, 1.0 M NaCl, 2 mM EDTA- Na_2) wurde mit Hilfe eines LKB-Ultragrad gemischt und in einen mit 3500 rpm laufenden Beckman-Ti14-Zonalrotor gepumpt. 250 O.D. 260 DNA (entsprechend etwa 12.5 mg) wurden gegen Hochsalz-Puffer dialysiert und so mit 30 %iger Saccharose vermischt, daß die aufzuschichtende Probe 4 Prozent Saccharose enthielt. Das Probenvolumen betrug 16 ml. Auf die Probe wurden noch 30 ml Hochsalz-Puffer geschichtet. Die Zentrifugation wurde bei 4 °C und 45 000 rpm 17 Stunden lang durchgeführt.

Der Gradient wurde durch Unterschichten mit einer 50 %igen Saccharose-Lösung (in 1.0 M NaCl) ausgepumpt. Das Profil der optischen Dichte wurde mit Hilfe eines Beckman-Spektrometers aufgezeichnet, das Profil der Saccharose-Dichte wurde refraktometrisch bestimmt.

Am Boden des Gradienten (Pumpvolumen von mehr als 580 ml) befindet sich Material von mehr als 35 s. Der große Peak in der Mitte des Gradienten ist M13-RF I-DNA, der kleinere benachbarte Peak zum Meniscus hin M13-RF II-DNA. Im Bereich des Meniscus befinden sich niedermolekulare Fragmente.

Die Säulenfraktionen A und B enthalten drei wesentliche Komponenten, M13-RF-DNA, Coli-DNA, die auf neutralen Saccharose-Gradienten mit mehr als 30 s sedimentiert, und kleinere DNA-Fragmente. Diese drei Komponenten lassen sich auch auf neutralen Gradienten voneinander trennen (Abbildung 7). Somit kann M13-RF-DNA nach der Vorreinigung mittels Säulenchromatographie auch unter schonendsten Bedingungen hoch gereinigt werden. Man wird RF-DNA über alkalische Gradienten reinigen, wenn man rasch große Mengen zur Hybridisation benötigt. Im Prinzip ist aber auch die Reinigung der völlig nativ belassenen DNA in der beschriebenen Weise möglich. Dies ist besonders für in-vitro-Studien an der RF-DNA bedeutsam.

Ein Nachteil der Säulenchromatographie besteht vielfach, so auch hier, in der Verdünnung des Materials. Man ist nach der Chromatographie fast immer gezwungen, das eluierte Material zu konzentrieren. Es hat sich bewährt, das Eluat in einen Dialyseschlauch zu überführen und in einem Bett aus Polyäthylenglykol 20 000 (Carbowax, Serva) einzuengen. Eine extensive Dialyse gegen einen geeigneten Puffer muß sich anschließen.

E. Durchführung der Experimente

Im folgenden Abschnitt werden experimentelle Einzelheiten beschrieben, die für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung sind. Hingegen werden Methoden, die der Literatur entnommen wurden und allgemeine Verbreitung gefunden haben, in einem besonderen Abschnitt aufgeführt (vgl. Abschnitt G: Materialien und Standard-techniken).

1. M13-spezifische RNA in *E. coli* AB301 NTG-Rif^S: Abschätzung der durchschnittlichen Molekülgröße des primären Transcriptionsprodukts und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit

Bedingungen der Bakterienkultur: AB301 NTG-Rif^S wurde bei 30 °C in einem modifizierten H-Medium kultiviert (Maaløe und Hanawalt, 1961; vgl. Abschnitt G). Die Generationszeit betrug 60 Minuten (vgl. Abbildung 1). Thymin ad 100 µg/ml und Desoxyadenosin ad 300 µg/ml wurden der Kultur bei einem Titer von 1.5×10^8 /ml zugefügt, um später die M13-Reproduktion zu verbessern. Bei 2×10^8 /ml wurden die Zellen mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 20).

"Pulse": 25 Minuten nach Infektion wurde 5-³H-Uracil (28 Ci/mM; 80 µCi/ml) zugegeben, 26 Minuten nach Infektion Rifampicin ad 100 µg/ml.

Rifampicin (Grünenthal) wurde 20fach konzentriert in Dimethylsulfoxid (DMSO) mit einer Spur 2-Mercapto-Aethanol gelöst; die Endkonzentration von DMSO in der Kultur betrug 0.55 % v/v. Diese Konzentration beeinflusst den bakteriellen Stoffwechsel nicht.

Reinigung der RNA: Zu verschiedenen Zeiten wurden der Kultur gleich große Proben entnommen und sofort im Verhältnis 1:1 mit Phenol vermischt (Altman, 1971). Das Phenol war über Zinkstaub destilliert und mit 0.08 % w/v 8-Hydroxychinolin stabilisiert, hatte eine Temperatur von 70 °C und enthielt einen Zusatz von 2 % SDS. Der pH

der Mediumphase über dem Phenol fiel auf 5.5. Es handelte sich also um eine heiße Phenolisierung bei saurem pH, wie sie von Scherrer beschrieben wurde (Scherrer, 1969). Diese Art der Phenolisierung ist für RNA-Präparationen besonders geeignet, weil sie bei der hohen Temperatur unspezifische Aggregate bricht und bei dem niedrigen pH DNA eliminiert. Die RNA wurde, wie bei Scherrer beschrieben, zunächst mit Pronase zur Elimination möglicher RNAase-Kontaminationen und dann mit DNAase (Worthington, RNAase-frei, getestet!) zur Beseitigung letzter DNA-Spuren behandelt. Absolute Reinheit, Freiheit von DNA und von Spuren basischer Proteine ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für die RNA-DNA-Hybridisierung (Gillespie, 1968).

Die gereinigte RNA hatte eine spezifische Radioaktivität von etwa 30 000 ^3H -cpm/ μg .

Acrylamid-Gelelektrophorese: Die gereinigten RNA-Proben wurden auf 3 % Acrylamid-0.15 % Methylenbisacrylamid-Gelen (Bishop et al., 1967) fraktioniert. Die Gele wurden nach der Elektrophorese eingefroren und in 2-mm-Scheibchen zerschnitten. Dann wurden die RNA-Fractionen 24 Stunden lang bei 25 °C in 6 x SSC-Puffer mit 0.15 % SDS eluiert. (1 x SSC-Puffer ist 0.15 M NaCl und 0.015 M Natriumcitrat, pH 7.0.)

Aus jeder Eluatfraktion wurde eine Probe in Kinard's Szintillationsreagens pipettiert, um das Brutto-Radioaktivitätsprofil in einem Szintillationszähler bestimmen zu können. Außerdem wurden aus jeder Eluatfraktion der ersten 2 cm jedes Gels, vom Meniscus aus gerechnet, Proben in 0.3 M NaOH pipettiert, 15 Stunden lang bei 45 °C inkubiert und mit TCA gefällt, um zu belegen, daß die Fractionen völlig labil in Alkali beziehungsweise von DNA-Spuren frei waren.

Hybridisierung: Die RNA-Fractionen wurden gegen denaturierte M13-RF-DNA hybridisiert, die auf Nitrocellulose-Filtern gebunden war (Gillespie und Spiegelman, 1965). Von 2 μg denaturierter M13-RF-DNA waren 85 %, das heißt 1.7 μg , an Nitrocellulose-Filter der Porenweite 0.45 μm gebunden. Pro Filter standen also 0.85 μg M13-Minus-Strang-DNA zur

Verfügung. Die Hybridisations-Flüssigkeit enthielt 1.6 ml Eluat und 0.4 ml phenolgesättigten 6 x SSC-Puffer, pH 7.0. Hybridisiert wurde bei 66 °C für 20 Stunden, um eine quantitative Reaktion zu gewährleisten. Dann wurden die Proben rasch auf 4 °C gekühlt, zweimal in 6 x SSC gewaschen, mit RNAase behandelt (30 µg/ml RNAase aus Rinderpancreas, in 2 x SSC und 1 mM EDTA-Na₂, Inkubation 90 Minuten bei Raumtemperatur), nochmals in 6 x SSC gewaschen, getrocknet und in Toluol-Szintillator gezählt.

Interner Standard: Kinetiken, denen komplizierte Aufarbeitungs- und Reinigungstechniken folgen, erfordern die Korrektur und Normalisierung unweigerlich auftretender, variabler Verluste.

Für das hier beschriebene Experiment wurden nicht infizierte AB301 für drei Generationszeiten mit 2-¹⁴C-Uracil markiert, dann sorgfältig gewaschen und eingefroren. Bei einer derartigen Langzeit-Markierung erscheint die Radioaktivität fast ausschließlich in der reifen, ribosomalen RNA und in der tRNA.

Von diesen Zellen wurde der Bakterienkultur 27 Minuten nach Infektion eine bestimmte Menge zugefügt, also eine Minute nach Rifampicin-Zugabe. Die ¹⁴C-markierte RNA dieser Zellen diente in dreierlei Weise als interner Standard für die nachfolgenden Aufarbeitungsschritte:

1. als interner Standard zur Normalisierung; 2. nach der Gelelektrophorese als Molekulargewichts-Standard der Fraktionen reifer, ribosomaler RNA und tRNA; 3. als Indikator unspezifischer Hybridisation: Einige Filter zeigten nach der Hybridisation ¹⁴C-Radioaktivität, das heißt ribosomale RNA des Standards, die nur auf Grund unspezifischer Filterbindung, ungenügender Waschprozeduren und ungenügender RNAase-Behandlung auf den Filtern verblieben sein konnte. Da aber auf denselben Filtern auch eine entsprechende ³H-Kontamination ribosomaler RNA angenommen werden konnte, wurden die Werte für die hybridisierte Radioaktivität entsprechend anteilig korrigiert.

2. Isolation und Identifikation des M13-Gen-5-Produkts

Prinzip: Das M13-Gen-5-Produkt kann aus einer Cytoplasma-Fraktion M13-infizierter Coli-Bakterien isoliert werden, die von DNA und von Membran- und Wandbestandteilen befreit ist (Oey und Knippers, 1972; Alberts et al., 1972). Es handelt sich um ein Protein, das an einzelsträngige, virale M13-DNA bindet und deren Komplementation zu RF-DNA verhindert (vgl. Abschnitte B.2 und C.3). Daher ist erklärlich, daß dieses Protein durch Affinitätschromatographie an DNA-Cellulose isoliert wird (Alberts und Herrick, 1971; Alberts et al., 1972).

Alberts et al. fanden, daß das an DNA-Cellulose gebundene Protein bei einer Kochsalz-Konzentration zwischen 0.6 M und 2.0 M eluiert wird.

Bei der Nacharbeitung dieser Experimente ergab sich, daß das Protein schon bei einer Kochsalz-Konzentration von 0.4 M im Eluat erscheint, während bei höheren Salzkonzentrationen kaum noch Material freigesetzt wird (Abbildung 8A).

Für den Unterschied zwischen den Daten von Alberts et al. und dem eigenen Befund bieten sich mehrere Erklärungen an. Es könnte der Typ der benutzten Cellulose eine Rolle spielen und vor allem die benutzte DNA-Präparation. Außerdem könnte der Mikro-Maßstab der eigenen Präparation von Bedeutung sein, der einen sonst bei der Bindung des Gen-5-Proteins zur Wirkung kommenden kooperativen Effekt nicht zuläßt. Deshalb kann die zur Elution notwendige Salzkonzentration vermindert sein (vgl. Alberts et al., 1972).

Obwohl es sehr wahrscheinlich war, daß das bei 0.4 M eluierte Material das Gen-5-Produkt repräsentierte, war es notwendig, dieses Material eindeutig zu identifizieren. Dies geschieht am einfachsten durch den Vergleich von Bedingungen, unter denen das Gen-5-Produkt gefunden beziehungsweise nicht gefunden werden kann. Gefunden wird das Protein in M13-Wildtyp-infizierten Zellen, nicht gefunden wird es in uninfizierten Zellen und in M13-am5-infizierten Zellen unter nicht-permissiven Bedingungen. Einen weiteren Hinweis ergibt das Molekulargewicht des zu iden-

tifizierenden Materials, das sich in erster Annäherung aus der Acrylamid-Gelelektrophorese ableiten läßt. Das Molekulargewicht des Proteins wird auf Grund der Sequenzierungsdaten mit knapp 10 000 d angegeben (Nakashima et al., 1974; Cuypers et al., 1974).

Bedingungen der Bakterienkultur: Die benutzten Zellen waren E. coli K38 (F^+ , su^-) und K37 (F^+ , su^+), M13-sensitive Wirte, die nicht permissiv beziehungsweise permissiv für amber-Mutanten sind.

K38 wurden bei 30 °C in einem modifizierten H-Medium kultiviert (siehe Abschnitt G), das von jeder Aminosäure 50 µg/ml (von der L-Form, vom Racemat die doppelte Menge), von L-Leucin aber nur 10 µg/ml enthielt.

Bei einem Titer von 2×10^8 /ml wurde die Kultur geteilt, ein Teil wurde mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 20), ein Teil mit M13-am5 (Infektionsmultiplizität 100, berechnet auf Grund des Titers auf K37), der dritte Teil blieb uninfiziert.

Radioaktive Markierung: Nach der Teilung und der Infektion wurde radioaktives Leucin zugegeben, der M13-Wildtyp-infizierten Kultur 4,5- 3H -L-Leucin (58 Ci/mM; 5 µCi/ml), der M13-am5-infizierten ebenfalls 3H -L-Leucin in gleicher Menge und der uninfizierten Kultur 2- ^{14}C -L-Leucin (46 mCi/mM; 0.5 µCi/ml). Die Kultur wurde für zwei Stunden fortgesetzt.

Präparation einer rohen Protein-Fraktion, " s_{30} ": Die Zellen wurden abzentrifugiert und in H-Salz-Puffer gewaschen. Dann wurde Lysozym zugegeben (50 µg/ml), EDTA- Na_2 (5 mM) und 2-Mercapto-Aethanol (1 mM). Die Zellsuspensionen wurden bei 37 °C inkubiert, eingefroren und aufgetaut, bis die Lyse komplettiert zu sein schien. Dann wurden $MgCl_2$ (50 mM) und DNAase (aus Rinderpancreas, 20 µg/ml) zugegeben und die DNA 30 Minuten lang bei Raumtemperatur verdaut. Schließlich wurden Membran- und Wandbestandteile durch eine Zentrifugation bei 30 000 g abgetrennt. Der Überstand, " s_{30} ", wurde drei Tage lang gegen dreimal 200 Volumina Puffer A (Alberts et al., 1972: 50 mM NaCl, 5 mM EDTA- Na_2 , 1 mM 2-Mercapto-Aetha-

nol, 20 mM Tris-HCl pH 8.1) dialysiert, um Magnesiumionen zu entfernen und dadurch die DNAase zu inaktivieren.

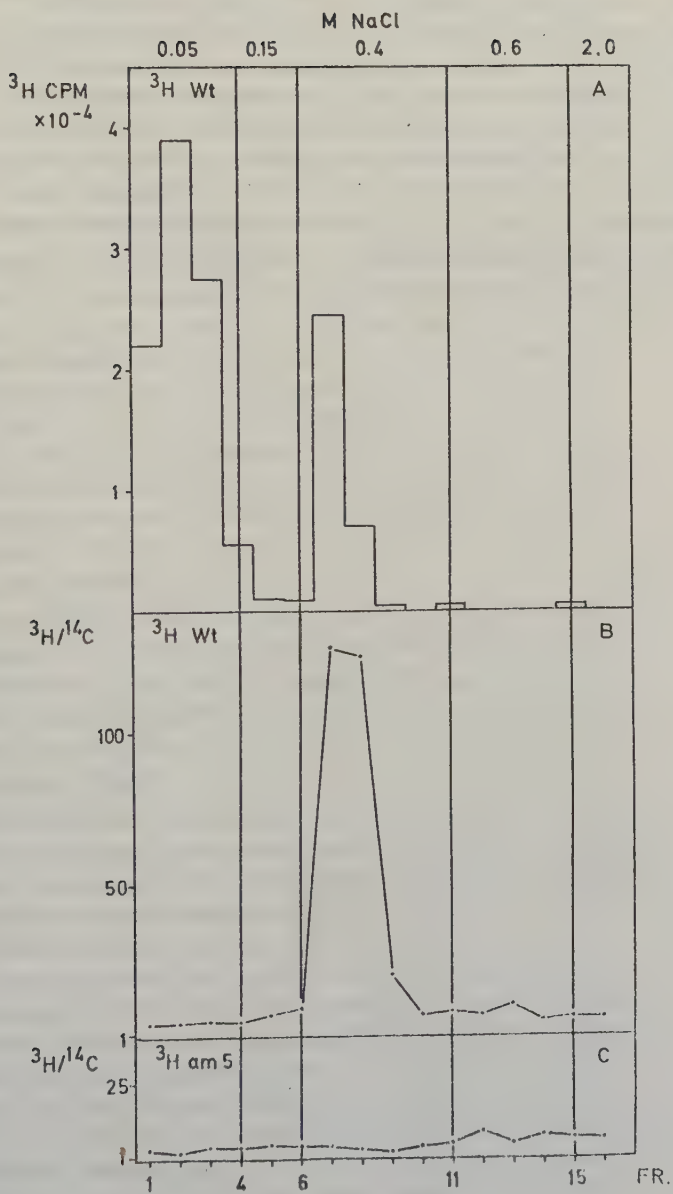
DNA-Cellulose-Chromatographie: Die Methodik entsprach der von Alberts und Mitarbeitern angegebenen (Alberts und Herrick, 1971; Alberts et al., 1972).

Whatman CF11-Cellulose wurde gewaschen, wie von Alberts und Herrick beschrieben. Kalbsthymus-DNA wurde in Wasser (mit 1 mM EDTA- Na_2) gelöst, durch Erhitzen denaturiert und an die Cellulose adsorbiert. Die DNA-Konzentration betrug schließlich etwa 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gepackter Cellulose-Suspension. Als Säulen wurden Tuberkulin-Spritzen benutzt, deren Konus mit Glaswolle verschlossen war. Jede Säule enthielt etwa 250 μg einzelsträngige, an Cellulose gebundene DNA. Die Chromatographie fand im Kühlraum bei 4 °C statt. Die Eluationsgeschwindigkeit betrug etwa 4 ml/Stunde. Säulenpuffer war der Puffer A, versetzt mit 10 % v/v Glycerin und wechselnden Mengen Kochsalz. Die dialysierten s_{30} -Proben wurden vor der Chromatographie mit 10 % v/v Glycerin versetzt.

Cochromatographiert wurden einerseits tritierte Proteine aus M13-infizierten Zellen und ^{14}C -markierte Proteine aus uninfizierten Zellen, und andererseits tritierte Proteine aus M13-am5-infizierten Zellen und ^{14}C -markierte Proteine aus uninfizierten Zellen (Abbildungen 8B und 8C).

Abb. 8: Identifikation des M13-Gen-5-Proteins durch Cochromatographie über eine Einzelstrang-DNA-Cellulose-Säule. Cochromatographiert wurden ^3H -markierte Proteine aus M13-Wildtyp-infizierten Zellen (8A und B) sowie ^3H -markierte Proteine aus M13-am5-infizierten Zellen (8C) jeweils mit ^{14}C -markierten Proteinen aus uninfizierten Zellen. Die Eluatfraktionen betrugen 0.6 ml, entsprechend einem Säulenvolumen. Die Radioaktivität wurde durch TCA-Fällung der Fraktionen mit je 50 μg Lysozym als Carrier bestimmt.

Von der Säule wird nur eine M13-spezifische Proteinfraction bei 0.4 M Kochsalz eluiert, die wohl in M13-Wildtyp-infizierten Zellen, nicht aber in M13-am5-infizierten Zellen auftritt: Es handelt sich dabei um das M13-Gen-5-Protein.



Bei 0.05 M Kochsalz und bei 0.15 M Kochsalz erscheint der weitaus größte Teil der Proteine (sogenannte Waschfraktionen). Weiteres Material erscheint bei Elution mit 0.4 M Kochsalz. Das hohe $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis dieser Fraktionen beweist, daß das Material nur in M13-Wildtyp-infizierten Zellen auftritt, nicht jedoch in M13-am5-infizierten Zellen. Daraus ergibt sich, daß es sich bei dem eluierten Material um das M13-Gen-5-Protein handeln muß. Bei höheren Salzkonzentrationen erscheinen keine nennenswerten Materialmengen mehr.

3. Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt während des Infektionszyklus beziehungsweise in Gegenwart von Rifampicin

Die jeweilige Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt entspricht der Menge der vorhandenen, biologisch aktiven M13-Gen-5-mRNA. Sie kann gemessen werden als Menge der in der Zeiteinheit in das Protein inkorporierten Radioaktivität (Abschnitt C.3).

Bedingungen der Bakterienkultur: AB301 NTG-Rif^S wurden bei 30 °C in einem modifizierten H-Medium kultiviert, das von jeder Aminosäure 50 µg/ml (von der L-Form, vom Racemat die doppelte Menge), von L-Leucin aber nur 10 µg/ml enthielt. Thymin ad 100 µg/ml und Desoxyadenosin ad 300 µg/ml wurden bei einem Titer von 1.5×10^8 /ml zugefügt. Bei 2×10^8 /ml wurden die Zellen mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 100). Rifampicin wurde, wenn vorgesehen, zum jeweiligen Zeitpunkt ad 100 µg/ml zugegeben. Das Rifampicin war konzentriert in DMSO gelöst (vgl. Abschnitt E.1).

Radioaktive Markierung: Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden der Kultur 9 ml entnommen und in ein vorbereitetes Reagensglas mit 0.5 mCi 4,5-³H-L-Leucin (58 Ci/mM) pipettiert. Die Kultur wurde zwei Minuten lang bei 30 °C fortgesetzt und dann durch Einfrieren in einem Trockeneis-Aceton-Bad gestoppt.

Präparation einer rohen Protein-Fraktion, "s₃₀": Die Präparation entsprach weitgehend dem in Abschnitt E.2 angegebenen Verfahren. Allerdings mußte die Methodik in einigen Punkten an die besonderen Bedürfnisse der Kurzzeitmarkierung angepaßt werden.

Jeder der eingefrorenen Proben wurden vor dem Auftauen hinzugefügt: 0.4 ml einer Übernachtskultur AB301 NTG-Rif^S als Trägermaterial zur Vermeidung von Verlusten bei den anschließenden Waschprozeduren; ein interner Standard; Na₃N ad 120 mM, Chloramphenicol ad 500 µg/ml und kaltes Leucin ad 650 µg/ml zur Verhinderung jeder weiteren Inkorporation von Radioaktivität. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und in einem Puffer weiterverarbeitet,

der neben H-Salzen 10 mM NaN_3 , 200 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol und 1 mg/ml Leucin enthielt. Die weitere Aufarbeitung entsprach den Verhältnissen bei der Langzeitmarkierung.

DNA-Cellulose-Chromatographie: Siehe Abschnitt E.2.

Interner Standard: Als interner Standard dienten M13-Wildtyp-infizierte AB301 NTG-Rif^s, die in der in Abschnitt E.2 beschriebenen Weise drei Generationszeiten lang mit ^{14}C -L-Leucin markiert worden waren. Gleiche Mengen dieser Zellen, entsprechend 150 000 ^{14}C -cpm TCA-fällbarer Radioaktivität, wurden zu jeder der eingefrorenen Proben vor dem Auftauen hinzugegeben.

4. M13-spezifische RNA in E. coli AB301-105 (RNAase III⁻)

Die Isolation und die wesentlichen Eigenschaften der Mutante wurden beschrieben (Kindler et al., 1973; Dunn und Studier, 1973; Nikolaev et al., 1973; Nikolaev und Schlessinger, 1974; siehe auch Abschnitt B.3.4).

4.1 Wachstumseigenschaften der Mutante AB301-105 in einem vollsynthetischen Medium

Problematisch für die hier beschriebenen Experimente war, daß die Mutante zwar in reichen, wenig definierten Medien wie zum Beispiel M3 gut wächst, das heißt mit etwa derselben Generationszeit wie AB301 (Kindler et al., 1973), daß sie aber in synthetischen Medien eine außerordentlich hohe Generationszeit hat (Nikolaev et al., 1973). In dem für AB301 NTG-Rif^S verwendeten Medium (vgl. Abschnitt E.1) hatte AB301-105 eine Generationszeit von etwa 3 Stunden bei 30 °C. Es liegt auf der Hand, daß eine derartig hohe Generationszeit kaum einen exakten Vergleich der für AB301-105 erhobenen kinetischen Daten mit denen von AB301 NTG-Rif^S erlaubt hätte. Denn zwischen der Generationszeit und der Kinetik der makromolekularen Stoffwechselprozesse besteht eine umgekehrt proportionale Korrelation.

Ein synthetisches Medium ist aber erforderlich, will man RNA effizient mit tritiierten Basen markieren. Es war daher **notwendig**, nach Zusätzen für synthetische Medien zu suchen, welche die Generationszeit von AB301-105 herabzusetzen in der Lage sind. Es mußte nach bisher unerkannten Stoffwechseldefekten der Mutante gesucht werden. Dies geschah aus Gründen der Zeitersparnis nur in grob orientierender Weise. Es wurde nicht nach definierten genetischen Markern gesucht.

Eine Beobachtung wies den Weg: AB301-105 wächst gut in CW-Medium, das sich aus technischem Caseinhydrolysat, Hefe-Extrakt, Salz und einer Kohlenstoffquelle zusammensetzt (Kindler et al., 1973). Ersetzt man irrtümlich das technische Caseinhydrolysat durch höher gereinigtes, vitaminfreies Caseinhydrolysat, verlängert sich die Ge-

nerationszeit auf den Wert, den man von synthetischen Medien gewohnt ist. Die günstige Generationszeit in CW-Medium resultiert offenbar aus der höheren Konzentration an Vitaminen in reichen Medien.

Daher wurde ein Medium benutzt, das auf H-Salzen, Glycerin und Glucose als Kohlenstoffquellen und definierten Mengen von Aminosäuren basiert und dem Vitamine zugesetzt wurden (siehe Abschnitt G). In diesem vollsynthetischen Medium hat AB301-105 eine Generationszeit von 85 - 90 Minuten bei 30 °C; dies ist ein Wert, der einen Vergleich mit AB301 NTG-Rif^S erlaubt. Die Replication von M13 verläuft allerdings weniger effizient als in AB301 beziehungsweise AB301 NTG-Rif^S (Kindler et al., 1973; Abbildung 9; vgl. Abbildung 1).

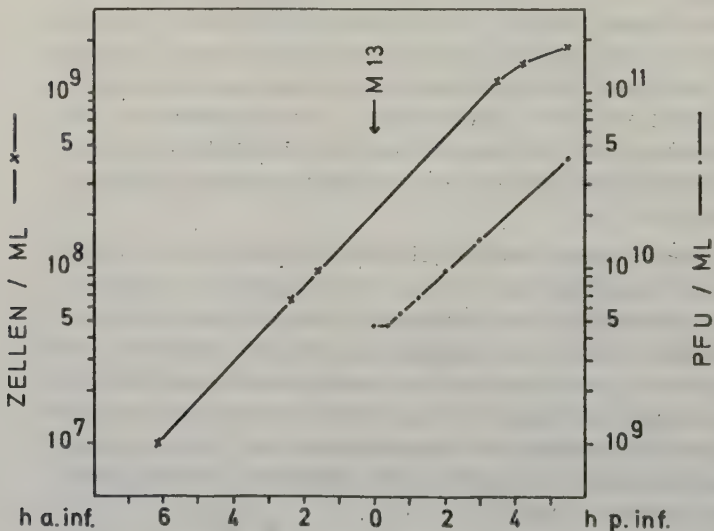


Abb. 9: Kultur von AB301-105 in vollsynthetischem Medium (vgl. Abschnitt G) bei 30 °C. Bei einem Zelltitert von 2×10^8 /ml Infektion mit M13 Wildtyp (Infektionsmultiplizität 20). Die Phagenreplication ist weitaus weniger effizient als in AB301 NTG-Rif^S (vgl. Abbildung 1).

4.2 Molekulargewichtsverteilung M13-spezifischer RNA in AB301-105 und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit

Die Durchführung des Experiments entsprach im wesentlichen dem Experiment mit AB301 NTG-Rif^S (vgl. Abschnitte E.1 und G). Einige Änderungen mußten vorgenommen werden, weil der M13-spezifische Stoffwechsel in AB301-105 weit weniger aktiv ist und die erzielte spezifische Radioaktivität der RNA erheblich niedriger liegt.

Bedingungen der Bakterienkultur: Eine Übernachtskultur von AB301-105, in CW-Medium bei 34.5 °C gezogen, wurde 1:100 in vollsynthetisches H-Medium überimpft und bei 30 °C kultiviert. Die Generationszeit betrug 90 Minuten. Bei einem Titer von 5×10^7 /ml wurde der Kultur 2-¹⁴C-Uracil (50 mCi/mM; 0.08 µCi/ml) zugegeben. Die ¹⁴C-Markierung wurde in ribosomale RNA eingebaut und diente, wie bei dem Experiment mit AB301 NTG-Rif^S, als interner Standard.

Bei einem Titer von 2×10^8 /ml wurden die Zellen mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 20).

"Pulse": 2 3/4 Stunden nach Infektion wurden zugegeben: 5-³H-Uracil (28 Ci/mM; 45.5 µCi/ml) und 8-³H-Adenin (28 Ci/mM; 45.5 µCi/ml).

Zwei Minuten später wurde Rifampicin ad 300 µg/ml zugegeben. Das Rifampicin war 10fach konzentriert in DMSO gelöst. Die DMSO-Konzentration in der Kultur betrug 0.5 Prozent v/v. Wie ein Vorversuch gezeigt hatte, unterbinden 300 µg/ml Rifampicin die RNA-Synthese in AB301-105 vollständig. Von AB301-105 ein für Rifampicin hypersensitives Derivat herzustellen, war aus naheliegenden Gründen nicht möglich: Man hätte unter Umständen erhebliche Veränderungen der Eigenschaften der Mutante in Kauf nehmen müssen. Die Rifampicin-Wirkung auf AB301-105 wird in Abschnitt F gezeigt.

Reinigung der RNA: Zu verschiedenen Zeiten wurden der Kultur gleich große Proben entnommen. Die RNA wurde genau so gereinigt, wie es in Abschnitt E.1 beschrieben ist. Die gereinigte RNA hatte eine spezifische Radioaktivität

von nur etwa 4 000 ^3H -cpm/ μg .

Acrylamid-Gelelektrophorese: Da in AB301-105 Molekulargewichts-Spezies der RNA von über 2×10^6 d zu erwarten waren, wurden die RNA-Proben auf 2 %-Acrylamid-0.1 %-Methylenbisacrylamid-0.5 %-Agarose-Gelen fraktioniert (Peacock und Dingman, 1968).

Parallel und um die Stabilität überlanger RNA-Moleküle in desaggregierenden Agentien zu belegen, wurden Proben auf Formamid-Gelen fraktioniert (3.5 %-Acrylamid-0.5 %-Methylenbisacrylamid, gelöst in reinem Formamid; Staynov et al., 1972).

Die Elution der Gelscheibchen wurde auf 36 Stunden ausgedehnt, da hochmolekulare RNA verzögert eluiert wird. Das Brutto-Radioaktivitätsprofil und die Freiheit von DNA der fraktionierten RNA-Proben wurden analysiert, wie in Abschnitt E.1 beschrieben wurde.

Hybridisation: Der Hybridisationsprozeß lief ab, wie früher beschrieben wurde. Um der niedrigeren spezifischen Radioaktivität der RNA-Proben Rechnung zu tragen, wurden die Filter mit je 5 μg denaturierter M13-RF-DNA beladen.

F. Ergebnisse und Schlußfolgerungen

1. M13-spezifische RNA in E. coli AB301 NTG-Rif^S: Abschätzung der durchschnittlichen Molekülgröße des primären Transcriptionsprodukts und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit

1.1 Synthese zellspezifischer und phagenspezifischer RNA in Gegenwart von Rifampicin

In E. coli AB301 wurde M13-spezifische RNA von annähernd Genomlänge gefunden (Jacob und Hofschneider, 1969), die in Gegenwart von denaturierenden Agentien (DMSO) zu relativ kleinen Molekülen zerfiel (Jacob et al., 1973; vgl. Abschnitt B.3). Man schloß hieraus, daß es sich bei der langen RNA um ein unspezifisches Aggregat und damit um einen Artefakt handelte.

Neuere Vorstellungen, welche die Möglichkeit einer Reifung langer, primärer Transcriptionsprodukte zu kleineren Einheiten akzeptieren, erlauben jedoch auch eine andere Interpretation: Primär lange RNA-Moleküle, die in DMSO zerfallen, müssen nicht unspezifische Aggregate sein. Sie könnten ebenso spezifische Aggregate, nämlich Intermediärformen eines rasch ablaufenden Reifungsprozesses, darstellen.

Die RNA-Polymerase könnte prinzipiell die circuläre M13-RF-DNA endlos transcribieren; sekundäre, kleinere Einheiten würden dann jeweils nach ihrer Fertigstellung endonucleolytisch abgetrennt. Geht man davon aus, daß die Schnittstellen Schlingen sind, in deren Bereich Basen über Wasserstoffbrücken noch eine Zeitlang verbunden bleiben, würde sich daraus eine Erklärung für die gefundenen Aggregate ergeben.

Die klassischen Methoden der Molekulargewichtsbestimmung, vor allem Gradientenzentrifugation und Gelelektrophorese, sind ihrer Natur nach wenig geeignet, rasch ablaufende Reifungsprozesse sichtbar zu machen. Sie setzen eine langwierige Reinigung der RNA voraus. Daher analysiert

man mit ihrer Hilfe vorwiegend die relativ stabilen, sekundären Transcriptionsprodukte. Die äußerst instabilen, primären Transcriptionsprodukte sind leichter zu fassen, wenn es gelingt, den zeitlichen Ablauf ihrer Synthese zu verfolgen. Dies ermöglicht das im folgenden dargestellte Rifampicin-Experiment.

Rifampicin verhindert die Initiation von RNA-Molekülen, gestattet aber die Fertigstellung initiierteter Moleküle (vgl. Abschnitt C.1). Markiert man RNA mit radioaktiven Vorstufen in Gegenwart von Rifampicin, entspricht der Zeitpunkt, zu dem ein Maximum an Radioaktivität inkorporiert ist, dem Zeitpunkt der Termination der betrachteten Moleküle. Das Maximum wird um so später erreicht, je länger die synthetisierten RNA-Ketten sind. Ein "endloser" Transcriptionsprozeß an einer circulären DNA würde von Rifampicin nicht beeinflußt, da die Termination und damit die Notwendigkeit der Reinitiation entfällt.

Diese Methode erlaubt, wie weiter unten gezeigt werden wird, die Syntheseraten ribosomaler RNA in vivo abzuschätzen. Auf dieser Basis ergibt sich auch die Möglichkeit, die Molekülgröße der Transcriptionseinheiten M13-spezifischer RNA zu schätzen, und zwar unabhängig von der Molekülgröße der später tatsächlich dargestellten RNA.

Experimentelle Einzelheiten wurden in Abschnitt E.1 beschrieben. Eine Kultur von AB301 NTG-Rif^S wurde mit M13 Wildtyp infiziert (Zeitpunkt 0 Minuten), 25 Minuten später wurde Radioaktivität zugegeben, 26 Minuten später Rifampicin. Proben wurden der Kultur zu den Zeitpunkten 28, 29, 30, 32, 35 und 50 Minuten nach Infektion entnommen, also 2, 3, 4, 6, 9 und 24 Minuten nach der Zugabe von Rifampicin. Die RNA von allen Proben wurde gereinigt, auf Gelen fraktioniert, fraktionenweise eluiert und gegen denaturierte M13-RF-DNA hybridisiert. Bestimmt wurden die Profile der Gesamtradioaktivität und der M13-spezifischen, hybridisierten Radioaktivität (Abbildung 10). Von jeder Eluatfraktion (2 ml) wurden 1.6 ml in die Hybridisation eingesetzt, 0.08 ml dienten der Bestimmung der Gesamtradioaktivität der Fraktion. Als Gesamtradioaktivität

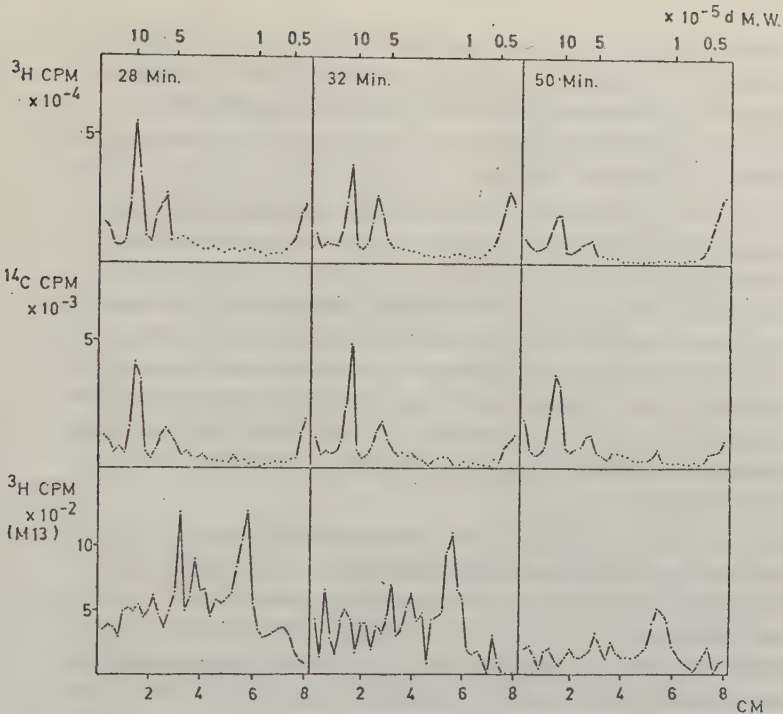


Abb. 10: Coli-spezifische und M13-spezifische RNA in AB301 NTG-Rif^S. Zum Zeitpunkt 0 Minuten Infektion mit M13 Wildtyp. 25 Minuten nach Infektion Zugabe von Radioaktivität, 26 Minuten nach Infektion Zugabe von Rifampicin. Probenentnahme 28, 29, 30, 32, 35 und 50 Minuten nach Infektion. Aufarbeitung der RNA. Weitere experimentelle Einzelheiten im Abschnitt E.1. Die Abbildung zeigt die Radioaktivitätsprofile von drei der Proben. Obere Reihe: Profile der Gesamtradioaktivität beziehungsweise der Menge der pro Fraktion in die Hybridisationsreaktion eingesetzten Radioaktivität. Mittlere Reihe: Radioaktivitätsprofile der RNA des internen Standards. Untere Reihe: Radioaktivitätsprofile der hybridisierten, M13-spezifischen RNA.

Die Abbildung erläutert drei, im Abschnitt F.1 dargestellte, Hauptbefunde:

1. Die hybridisierte RNA zeigt zum Teil Molekulargewichts-Spezies von annähernder Genomlänge (1.7×10^6 d). Die reale Existenz dieser Moleküle ist unwahrscheinlich auf Grund der Desaggregationsversuche von Jacob et al., 1973, und auf Grund der eigenen Daten zur Synthesekinetik (siehe Abschnitt F.1.1).
2. Die ribosomale RNA wird in Gegenwart von Rifampicin zum Teil wieder abgebaut (obere Reihe; siehe Abschnitt F.1.2).
3. Die hybridisierte RNA zeigt zwischen 32 und 50 Minuten nach Infektion (beziehungsweise zwischen 6 und 24 Minuten nach Rifampicin-Zugabe) eine deutliche Degradation (untere Reihe; siehe Abschnitt F.1.3).

jeder Fraktion wurde die Radioaktivitätsmenge angesehen, die sich aus der Hochrechnung von 0.08 ml auf 1.6 ml ergibt. Die Gesamtradioaktivität entspricht daher der errechneten Radioaktivitätsmenge, die in die Hybridisationsreaktion eingesetzt wurde.

Für die Kalkulationen und die darauf gründenden Schlüsse wurden nur Fraktionen berücksichtigt, die Molekulargewichte zwischen 1.7×10^6 und 4×10^4 d repräsentierten. Auf diese Weise wurden meniscusnahe Abschnitte der Gele, die erfahrungsgemäß keine genauen Rückschlüsse auf Molekulargewichte erlauben, und auch kleine Molekulargewichte ausgeschlossen, während alle die Molekulargewichte in die Betrachtung einbezogen wurden, in denen auf Grund früherer Erfahrungen (Jacob et al., 1970) M13-spezifische RNA zu erwarten war.

Addiert wurden die ^3H -counts der Gesamtradioaktivität und der hybridisierten, M13-spezifischen Radioaktivität im erwähnten Molekulargewichtsbereich, sowie die ^3H -counts der Fraktionen, die die 23s-ribosomale RNA und die 16s-ribosomale RNA repräsentierten. Die Summen wurden jeweils im Vergleich zum internen Standard normalisiert. Die Normalisierung gewährleistete die Kompatibilität der jeweils addierten Fraktionen.

Die errechneten Daten wurden in Tabelle 1 zusammengestellt. Die Tabelle zeigt, daß die Gesamtradioaktivität der zur Hybridisation eingesetzten RNA und die Radioaktivität der 23s-rRNA drei Minuten nach der Zugabe von Rifampicin ein Maximum erreichen. Das bedeutet, daß die letzten 23s-rRNA-Moleküle drei Minuten nach Rifampicin-Zugabe fertiggestellt sind. Die Radioaktivität der 16s-rRNA und die M13-spezifische, hybridisierte Radioaktivität erreichen bereits zwei Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum.

Geht man von der Voraussetzung aus, daß ribosomale RNA und mRNA und auch M13-spezifische RNA gleich schnell transkribiert werden (Bremer und Yuan, 1968), sollte die durchschnittliche Kettenlänge M13-spezifischer RNA-Moleküle ähnlich derjenigen der 16s-rRNA sein, welche üblicherweise mit 560 000 d angegeben wird (vgl. Bishop et

Probe: Min. nach Inf.	RIF	Gesamt-RNA	%	23s-rRNA	%	16s-rRNA	%	M13-RNA	%
28	2	372 000	98.4	105 600	97.7	83 700	100.0	19 300	100.0
29	3	378 000	100.0	108 100	100.0	67 000	80.0	17 200	89.0
30	4	360 000	95.2	99 500	92.1	61 200	73.2	16 000	82.9
32	6	310 000	82.0	77 300	71.5	55 400	66.2	13 900	72.0
35	9	265 000	70.4	51 600	47.7	41 500	49.6	12 000	62.2
50	24	162 000	42.6	46 200	42.9	26 500	31.7	6 200	32.2

Tabelle 1: Synthese und Abbau verschiedener RNA-Spezies aus AB301 NTG-Rif^S in Gegenwart von Rifampicin. Radioaktivität wurde 25 Minuten nach Infektion mit M13 zugegeben, Rifampicin 26 Minuten nach Infektion. Für die Kalkulation der Gesamtradioaktivität (Gesamt-RNA und M13-RNA) wurden die ³H-counts aller Fraktionen, die Molekulargewichte zwischen 1.7×10^6 und 4×10^4 d repräsentierten, addiert und im Vergleich zum internen Standard normalisiert. Für die Kalkulation der Radioaktivität in den beiden rRNA-Spezies wurden die ³H-counts der entsprechenden Fraktionen addiert und normalisiert; hier hatte die Normalisierung den wesentlichen Vorteil, daß eine Kompatibilität der addierten Fraktionen aus verschiedenen Proben erzielt wurde.

al., 1967).

Diese Überlegung wird nicht grundsätzlich durch die Vermutung entwertet, daß ribosomale RNA in *E. coli* zunächst als einheitliches Vorläufermolekül synthetisiert wird (Nikolaev et al., 1973). Denn 16s-rRNA wird vermutlich zuerst, vom 5'-Terminus weg, synthetisiert (Pato und von Meyenburg, 1970) und könnte prinzipiell sofort nach Fertigstellung freigesetzt werden. Ein intaktes Vorläufermolekül der ribosomalen RNA, das beide Komponenten, 23s- und 16s-rRNA, umfaßt, wird ja nur in AB301-105 gefunden, in einem Stamm, in dem Reifungsenzyme defizient sind.

Geht man von beiden Möglichkeiten aus, nämlich daß 23s-rRNA und 16s-rRNA jeweils für sich synthetisiert werden oder daß beide zunächst als Vorläufermolekül existieren, liegt der Unterschied nur in der jeweils anzunehmenden Syntheserate für rRNA-Moleküle. Im einen Fall, wenn nämlich 16s- und 23s-rRNA gleichzeitig und unabhängig voneinander initiiert werden, entsteht zwischen 2 und 3 Minuten nach Rifampicin-Zugabe nur die Kettenlänge, die der Differenz der beiden rRNA-Spezies entspricht (vgl. Bishop et al., 1967): $1.1 \times 10^6 - 0.56 \times 10^6 = 0.54 \times 10^6$. Im anderen Fall, wenn erst 16s- und danach erst 23s-rRNA in ein einheitliches Vorläufermolekül überschrieben werden, entsteht zwischen 2 und 3 Minuten nach Rifampicin-Zugabe die Kettenlänge des gesamten 23s-rRNA-Moleküls (1.1×10^6). Bei dieser Berechnung bleibt außer Betracht, was in den beiden ersten Minuten nach Rifampicin-Zugabe passiert. Es ist anzunehmen, daß bis zum vollen Wirkungseintritt des Rifampicins mehr als eine Minute vergeht (Schwartz et al., 1970; Pato und von Meyenburg, 1970). Die Werte für die Syntheseraten verschieben sich auch dann nur geringfügig, wenn man annimmt, daß von beiden rRNA-Spezies 10 - 20 Prozent längere Vorläufermoleküle existieren.

Im einen Fall ergibt sich aus der Rechnung eine in-vivo-Syntheserate von etwa 27, im anderen Fall von etwa 55 Nucleotiden pro Sekunde. Die entsprechenden Literaturangaben liegen zwischen 55 (Bremer und Yuan, 1968) und

48 bis 84 Nucleotiden pro Sekunde (Dougan und Glaser, 1974) in Abhängigkeit von den jeweiligen Kulturbedingungen.

Legt man eine Syntheserate von 55 Nucleotiden pro Sekunde zugrunde und nimmt an, daß Rifampicin bereits eine Minute nach Zugabe voll wirksam ist, kann in der verbleibenden Minute M13-spezifische RNA von höchstens 1.1×10^6 d Molekulargewicht synthetisiert worden sein. Der wahre Wert liegt vermutlich niedriger, weil die Rifampicin-Wirkung später einsetzt. Man darf also annehmen, daß in AB301 NTG-Rif^S als primäres Transcriptionsprodukt M13-spezifische RNA synthetisiert wird, deren durchschnittliche Größe deutlich unter der Genomgröße liegt. Natürlich ist dennoch vorstellbar, daß zu einem kleinen Prozentsatz M13-spezifische RNA-Moleküle von Genomlänge oder sogar von Überlänge synthetisiert werden; diese Moleküle sind dann als Produkte eines mangelhaften Terminationsvorgangs anzusehen (vgl. Abschnitt B.3).

Die hier dargestellte Überlegung macht für AB301 NTG-Rif^S das oben skizzierte Modell einer "Endlos"-Transcription der RF-DNA wenig wahrscheinlich. Für dieses Modell wurde angenommen, daß die kleineren RNA-Moleküle von weniger als Genomlänge, die man in AB301 NTG-Rif^S vorwiegend findet (Abbildung 10), von einer primär überlangen RNA abgeschnitten werden. Der Befund bestärkt dagegen die Vermutung, daß auf der M13-RF-DNA wenige kleinere Transcriptionseinheiten existieren. Die Hauptmasse der synthetisierten, M13-spezifischen RNA ist demnach kleiner als einer Genomlänge entspricht.

1.2 Ein Nebenbefund: Instabilität ribosomaler RNA in Gegenwart von Rifampicin

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Radioaktivitätsmenge neu synthetisierter RNA in Gegenwart von Rifampicin zunächst ein Maximum erreicht und dann abnimmt. Das ist zum Teil auf den Abbau der bakteriellen mRNA zurückzuführen.

Aus Abbildung 10 wird aber deutlich, daß von dem Zerfall in erheblichem Umfang auch ribosomale RNA betroffen ist. Ein ähnlicher Befund wurde auch von anderen Autoren erhoben (Ohnishi und Schlessinger, 1972; Craig et al., 1972a; Craig et al., 1972b).

Für diesen Befund gibt es keine einfache Erklärung. Man könnte vermuten, daß die Ursache des Abbaus der ribosomalen RNA eine schlecht koordinierte Synthese ribosomaler RNA und ribosomaler Proteine ist, so daß ribosomale RNA nicht in Ribosomen inkorporiert und damit stabilisiert werden kann. Solche Phänomene treten als Folge der "stringent control" auf (Craig et al., 1972b). In diesem Zusammenhang ist auch der Befund von Interesse, daß ribosomale Proteine in Gegenwart von Rifampicin teilweise instabil zu sein scheinen (Dennis, 1974).

1.3 Physikalische Halbwertszeit M13-spezifischer RNA in AB301 NTG-Rif^S

Das im Abschnitt F.1 skizzierte Rifampicin-Experiment gestattet es, nach der Synthese auch den Abbau der M13-spezifischen RNA zu verfolgen.

Die physikalische Halbwertszeit der M13-RNA in AB301 NTG-Rif^S wurde vor allen Dingen deshalb in Gegenwart von Rifampicin bestimmt, um festzustellen, ob sich ein nennenswerter Unterschied ergibt zwischen der Methode des kalten "Chase" (Jacob et al., 1970) und der Anwendung von Rifampicin.

Errechnet wurde die Menge hybridisierter, M13-spezifischer Radioaktivität jeder Probe im Molekulargewichtsbereich zwischen 1.7×10^6 und 4×10^4 d. Die Summe wurde jeweils mit dem internen Standard verglichen und normalisiert. Der Maximalwert wurde mit 100 Prozent gleichgesetzt. Die errechneten Daten wurden in Tabelle 1 zusammengestellt.

Trägt man die auf M13 bezogenen Daten aus Tabelle 1 graphisch auf, ergibt sich die Zerfallskurve der M13-spezifischen RNA (Abbildung 11). Aus ihr läßt sich die physikalische Halbwertszeit entnehmen.

Zunächst kann man feststellen, daß der Abbau der M13-spezifischen RNA in exponentieller Weise erfolgt, wie man es von einer mRNA erwartet (vgl. Abschnitt B). Die Kurve scheint jedoch nicht einheitlich, sondern diskontinuierlich zu sein. Jedenfalls ergibt sich keine andere Möglichkeit, die Punkte miteinander zu verbinden, als eine biphasische Kurve hineinzulegen.

Der initiale Schenkel des Abbaus ergibt eine physikalische Halbwertszeit von 6 - 7 Minuten, der folgende eine Halbwertszeit von 15 - 16 Minuten bei 30 °C. Dies entspricht etwa 10 beziehungsweise 25 Prozent der Generationszeit der Bakterien.

Ein vergleichbarer, für bakterielle mRNA bestimmter, Wert liegt erheblich niedriger: Die physikalische Halbwerts-

zeit bakterieller mRNA bei 30 °C wurde zu 2.5 Minuten entsprechend 2.5 Prozent der Generationszeit der Bakterien bestimmt (Schwartz et al., 1970).

Die Methode des kalten "Chase" (vgl. Abschnitt C.1) hatte für M13-spezifische RNA eine physikalische Halbwertszeit von 18 - 19 Minuten bei 37 °C ergeben, entsprechend etwa 40 Prozent der Generationszeit der Bakterien (Jacob et al., 1970).

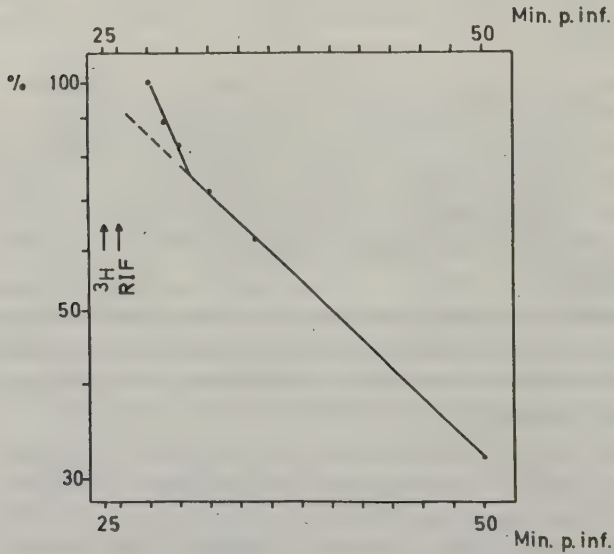


Abb. 11: Physikalische Halbwertszeit M13-spezifischer RNA in AB301 NTG-Rif^a. Graphische Auftragung der auf M13 bezogenen Daten aus Tabelle 1. Halblogarithmische Darstellung: Die Degradation verläuft exponentiell. Anscheinend ergibt sich keine einheitliche Kurve. Die Punkte lassen sich weder einer einheitlichen, linearen noch einer höheren exponentiellen Beziehung unterordnen.

Der initiale Schenkel der Kurve ergibt eine Halbwertszeit von 6 - 7 Minuten (entsprechend 10 % der Generationszeit der Bakterien), der folgende Schenkel eine Halbwertszeit von 15 - 16 Minuten (entsprechend 25 % der Generationszeit). Diskussion im Text.

Sowohl der kalte "Chase" als auch das Rifampicin-Experiment erlauben über die physikalische Halbwertszeit der M13-spezifischen RNA prinzipiell dieselbe Aussage: Sie liegt deutlich über der bakteriellen mRNA. Die Kurve, die sich aus dem Rifampicin-Experiment ergibt, verläuft etwas steiler als die des kalten "Chase". Dennoch beträgt der Unterschied eher Grade als Größenordnungen, so daß der Schluß berechtigt ist, daß der kalte "Chase" keine, wie befürchtet (Abschnitt C.1), überhöhten Resultate ergibt, die als Nachinkorporations- oder Reinkorporationseffekte erklärt werden müßten.

Ein besonderes Problem ist hingegen die Diskontinuität der Rifampicin-Kurve. Eine vergleichbar diskontinuierliche Kurve ergab sich auch bei der Bestimmung der biologischen Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA (siehe unten) und wurde von anderen Autoren beschrieben (Puga et al., 1973). Die Diskontinuität könnte aus einem unspezifischen Rifampicin-Effekt resultieren. Es könnte aber auch sein, daß Rifampicin-Daten den Ablauf von Synthese und Abbau in der Zelle genauer widerspiegeln als Daten aus "Pulse-Chase"-Experimenten.

Wenn man letzteres anzunehmen geneigt ist, könnte man die Diskontinuität der Kurve auf zweierlei Weise erklären:

1. Degradation von mRNA ist ein Prozeß, der aus zwei Phasen besteht, Inaktivierung und Degradation. Es ist möglich, daß als Folge des inaktivierenden Schrittes bereits ein beträchtlicher Teil des betroffenen RNA-Moleküls verschwindet (was den Rückgang der hybridisierbaren Radioaktivität erklärt), wohingegen der verbleibende, überwiegende Teil des Moleküls gegenüber Nucleasen resistenter ist.
2. Die Degradation betrifft zwei Klassen M13-spezifischer RNA, die unterschiedliche physikalische Halbwertszeiten aufweisen.

Im ersten Fall sollte man eine rasche und deutliche Verschiebung bestimmter (inaktivierter) Molekulargewichtsspezies zu kleineren Molekulargewichten hin erwarten. Im zweiten Fall sollte eine Molekulargewichtsspezies M13-

spezifischer RNA, sofern sie eine einheitliche mRNA-Spezies darstellt, schneller degradiert werden als eine andere.

Fraktionierung und Hybridisation der RNA ergeben bedauerlicherweise keine derartig scharfen Profile, daß einzelne Molekulargewichts-Spezies M13-spezifischer RNA unzweideutig erkennbar wären (Abbildung 10). Die in dieser Abbildung gezeigten Profile erlauben nicht, sich für eine der oben erwähnten Ursachen für die Diskontinuität der Zerfallskurve zu entscheiden. Der Grund dafür ist vermutlich in der langwierigen Prozedur der RNA-Präparation zu suchen, die keine ausreichend intakten Moleküle ergibt.

Aus den in diesem Abschnitt geschilderten Untersuchungen ist festzuhalten, daß sich die relativ hohe physikalische Halbwertszeit der M13-spezifischen RNA, die der kalte "Chase" ergeben hatte, im Rifampicin-Experiment bestätigt, so daß sich die Frage nach einer vergleichbar hohen biologischen Halbwertszeit einer M13-spezifischen mRNA-Spezies stellt (vgl. Abschnitt F.2.2).

2.1 Anstieg der Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt nach Infektion von AB301 NTG-Rif^S mit M13 Wildtyp

Der Versuch der Bestimmung der biologischen Halbwertszeit für die M13-Gen-5-mRNA ist nur sinnvoll, wenn zum Zeitpunkt der Rifampicin-Zugabe eine meßbare Menge Gen-5-Produkt pro Zeiteinheit synthetisiert wird.

Um geeignete Zeitpunkte für die Rifampicin-Zugabe herauszufinden, wurde zunächst untersucht, zu welchem Zeitpunkt nach Infektion das M13-Gen-5-Produkt in meßbarer Menge auftritt.

Eine Kultur von AB301 NTG-Rif^S wurde mit M13 Wildtyp infiziert. Zu bestimmten Zeiten nach Infektion wurde jeweils eine 2-Minuten-"Pulse"-Markierung durchgeführt und das Gen-5-Protein isoliert. (Details des Experiments wurden in Abschnitt E.3 beschrieben.)

Aus praktischen Gründen war es wichtig zu wissen, wie rein "Pulse"-markiertes M13-Gen-5-Protein von der DNA-Cellulose-Säule eluiert wird. Deshalb wurde die 0.4-M-Kochsalz-Eluatfraktion elektrophoretisch analysiert (Abbildung 12). Es zeigte sich, daß diese Fraktion zu 90 - 95 Prozent Gen-5-Protein repräsentiert. Kontaminierendes Protein macht in dieser Fraktion höchstens 10 Prozent der eluierten Radioaktivitätsmenge aus. Nimmt man also die in der 0.4-M-Kochsalz-Fraktion eluierte Radioaktivitätsmenge als spezifisch für Gen-5-Protein an, ergibt sich daraus nur ein kleiner Fehler, der in Kauf genommen werden kann. Daher wurde bei der Auswertung aller Synthesekapazitäts-Experimente so verfahren, daß die gesamte, bei 0.4 M Kochsalz eluierte, Radioaktivitätsmenge gleich gesetzt wurde mit der Menge an vorhandenem Gen-5-Protein. Diese Radioaktivitätsmenge wurde dann normalisiert im Vergleich zum internen Standard.

Es zeigt sich, daß bereits wenige Minuten nach Infektion mit M13 in jeweils 2 Minuten eine meßbare Menge M13-Gen-5-Protein synthetisiert wird (Abbildung 13). Danach scheint die in 2 Minuten synthetisierte Proteinmenge für mindestens 90 Minuten exponentiell anzusteigen.

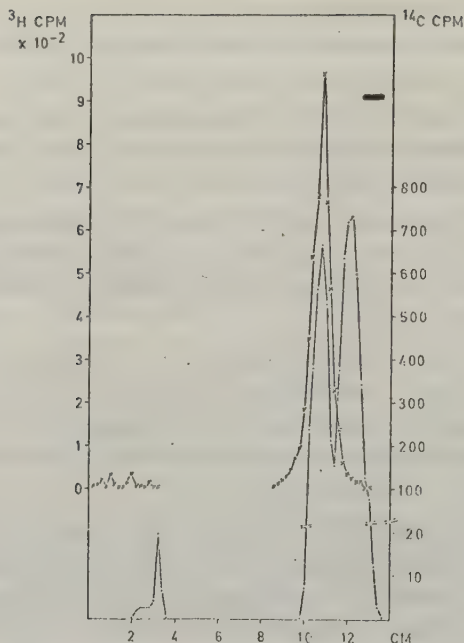


Abb. 12: Acrylamid-Gelelektrophorese einer Tritium-"Pulse"-markierten O.4-M-Eluatfraktion von der DNA-Cellulose-Säule (Abschnitt E.3) zusammen mit ^{14}C -markierten Referenzproteinen.

Das Radioaktivitätsprofil zeigt, daß die O.4-M-Eluatfraktion der DNA-Cellulose-Säule zu 95 % reines M13-Gen-5-Protein darstellt.

Die Elektrophorese wurde auf einem 12 % Acrylamid-0.2 % Methylenbisacrylamid-Gel mit Harnstoff und SDS durchgeführt (siehe Abschnitt G).

Die Probe enthielt tritiummarkiertes Material von der Säule, eine kleine Menge ^{14}C -markierten internen Standard von der Säule, ^{14}C -Leucin-markierte M13-Phagen (Herstellung siehe Abschnitt G), ^{14}C -Leucin-markiertes M13-Gen-5-Protein (Herstellung siehe Abschnitt E.2), 8 M Harnstoff, 10 % v/v Glycerin, 1 % SDS und Spuren von 2-Mercapto-Ethanol und Bromphenolblau. Die Probe wurde vor dem Auftragen 2 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt.

Der horizontale Strich markiert die Position des Farbstoffs Bromphenolblau nach der Elektrophorese. Die Referenzproteine sind das kleine Hüllprotein von M13 (M.W. 5 200 d), das große Hüllprotein (M.W. 70 000 d) und das Gen-5-Protein (M.W. 9 700), das auf Gelen wie ein Protein vom Molekulargewicht 8 000 läuft (Henry und Pratt, 1969).

Der Befund, daß M13-Gen-5-Protein schon frühzeitig in der infizierten Zelle auftaucht, obwohl seine Funktion vor allem in der späten Phase der Einzelstrang-Synthese notwendig ist, stützt die Vermutung, daß das Gen-5-Protein auch unmittelbar nach Infektion eine Rolle spielt bei der Replication M13-spezifischer DNA (Staudenbauer und Hofschneider, 1973). Möglicherweise übernimmt das M13-Gen-5-Protein die Funktion ähnlicher Coli-Proteine, die in der Lage sind, doppelsträngige DNA aufzuschmelzen und dadurch der Replication zugänglich zu machen (Weiner et al., 1975).

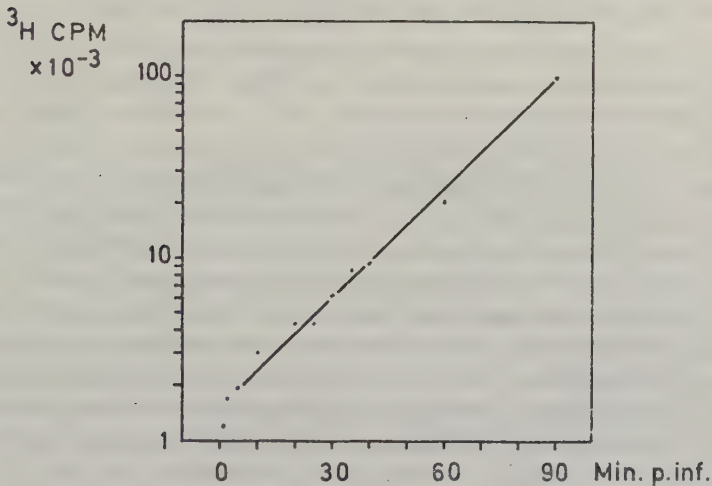


Abb. 13: Anstieg der Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Protein nach Infektion von AB301 NTG-Rif^S mit M13 Wildtyp. Die Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Protein scheint für einen langen Zeitraum nach Infektion exponentiell anzusteigen.

Jeder Punkt kennzeichnet den Beginn eines 2-Minuten-"Pulse". Das kurzzeitig markierte Gen-5-Protein wurde gereinigt, wie im Abschnitt E.3 beschrieben wurde. Die jeweilige Radioaktivitätsmenge wurde bestimmt und auf den Wert des internen Standards normalisiert.

Der steile Anstieg der Gen-5-Protein-Synthesekapazität (und damit der Menge vorhandener, biologisch aktiver, M13-Gen-5-mRNA) ist kaum zu erklären als Resultat der Transcription an wenigen, unmittelbar nach der Infektion synthetisierten, M13-RF-DNA-Molekülen. Man muß auf Grund des exponentiellen Anstiegs eher annehmen, daß die Menge biologisch aktiver M13-Gen-5-mRNA in dem Maß ansteigt, in dem M13-RF-DNA multipliziert wird und dann zur Transcription zur Verfügung steht.

Die auffallende Steilheit des Anstiegs reizt zu der Frage, welchen Anteil an der gesamten Proteinsynthesekapazität der Zelle die für das Genprodukt 5 maximal erreicht.

Aus der Kurve der Abbildung 13 läßt sich lediglich die zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandene Menge gereinigten Gen-5-Proteins ersehen.

Für den Zeitpunkt 90 Minuten nach Infektion wurde zusätzlich bestimmt, welche Radioaktivitätsmengen während der 2-Minuten-Kurzzeit-Markierung in verschiedenen Bereichen der Zelle inkorporiert wurden. Es ergab sich, daß etwa 30 Prozent der TCA-fällbaren Radioaktivitätsmenge in der " s_{30} "-Fraktion auftauchten, während 70 Prozent der TCA-fällbaren Radioaktivität im 30 000 x g-Pellet der Mikrosomen und Membranen auftauchte. Von den 30 Prozent der " s_{30} "-Fraktion wiederum machte die Radioaktivität des Gen-5-Proteins 25 - 28 Prozent aus. Von der gesamten, innerhalb von 2 Minuten inkorporierten Radioaktivität wurden also zum Zeitpunkt 90 Minuten nach Infektion mehr als 7 Prozent im Gen-5-Protein gefunden.

Bei einem Langzeit-Markierungs-Versuch (vgl. Abschnitt E.2 und Abbildung 8) machte die Radioaktivitätsmenge im M13-Gen-5-Protein etwa 7 Prozent der gesamten Radioaktivitätsmenge in der Zelle aus.

Daraus ergibt sich, daß die Synthesekapazität für das Gen-5-Protein bis zu einem Maximalwert von mindestens 7 Prozent der gesamten Synthesekapazität der Zelle ansteigt.

Zum Vergleich: Andere Autoren fanden (Smilowitz et al.,

1971), daß die Synthesekapazität für das f1-Gen-8-Protein, das kleinere Hüllprotein der filamentösen Phagen, 25 Minuten nach Infektion etwa 7 Prozent der gesamten zellulären Proteinsynthese ausmacht.

Diese beiden Werte erhellen, wie effizient die genetische Information der filamentösen Phagen exprimiert wird. Das Erstaunliche ist, daß die Gesamtmenge phagenspezifischer mRNA in der infizierten Zelle vergleichbare Werte nicht erreicht.

Aus den Daten der Tabelle 1 läßt sich errechnen, daß die M13-spezifische RNA einen Anteil von durchweg 4.5 - 5.0 Prozent an der Gesamt-RNA der Zelle hat. Unter den spezifischen Markierungsbedingungen beträgt der Anteil der ribosomalen RNA etwa 50 Prozent, so daß der Anteil der M13-spezifischen mRNA an der Gesamt-mRNA der Zelle 10 Prozent nicht übersteigt. Zehn Prozent phagenspezifischer mRNA, die acht Proteine codieren, belegen bereits mit zweien dieser Proteine 14 Prozent der zellulären Proteinsynthesekapazität!

Die Ursache für diese außerordentliche Effizienz der phagenspezifischen Translation könnte zum Beispiel die Stabilität der phagenspezifischen mRNA sein (vgl. Abschnitt B.3.6). Die Frage ist, wie stabil (im funktionellen Sinne) phagenspezifische mRNA wirklich ist. Es soll versucht werden, dies am Beispiel der M13-Gen-5-mRNA zu zeigen.

2.2 Biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA in AB301 NTG-Rif^S

Die Abnahme der Synthesekapazität für das M13-Gen-5-Produkt in Gegenwart von Rifampicin kann in derselben Weise beobachtet werden, wie ihr Auftreten nach M13-Infektion: durch 2-Minuten-Kurzzeit-Markierungen, wie sie im vorhergehenden Abschnitt erläutert wurden.

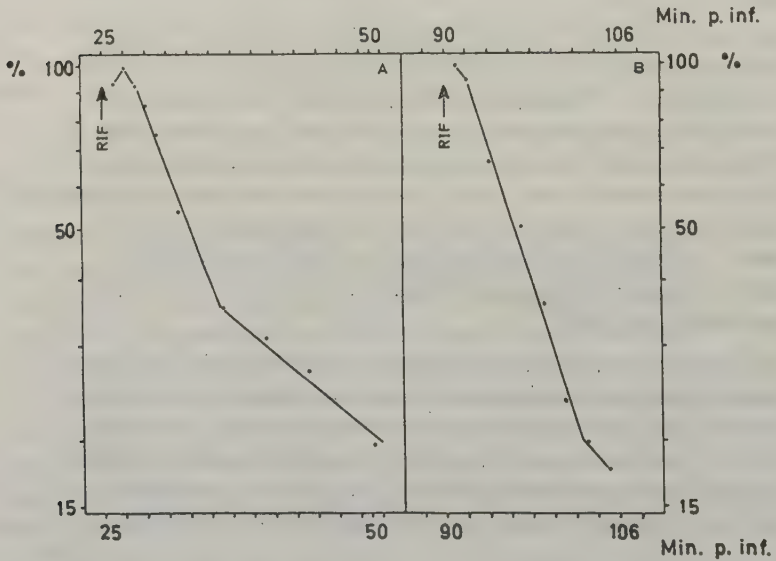


Abb. 14: Biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA zu frühen und späten Zeiten nach Infektion.

AB301 NTG-Rif^S wurde mit M13 Wildtyp infiziert (Zeitpunkt 0 Minuten). 25 beziehungsweise 90 Minuten nach Infektion wurde Rifampicin ad 100 µg/ml zugegeben. Jeder Punkt kennzeichnet den Beginn eines 2-Minuten-"Pulse". Das kurzzeitig markierte Gen-5-Protein wurde gereinigt, wie im Abschnitt E.3 beschrieben wurde. Die jeweiligen Radioaktivitätsmengen wurden bestimmt und im Vergleich mit dem Wert des internen Standards normalisiert. Während der ersten Phase nach Rifampicin-Zugabe ergibt sich zu frühen (A) und späten (B) Zeiten nach Infektion eine biologische Halbwertszeit von etwa 5 Minuten $\pm$ 10 Prozent. Etwa 10 - 12 Minuten nach Rifampicin-Zugabe scheint sich die M13-Gen-5-mRNA zu stabilisieren. Diskussion im Text.

Das Prinzip des Experiments wurde in Abschnitt C.3 und die experimentellen Einzelheiten wurden in Abschnitt E.3 erläutert.

AB301 NTG-Rif^S wurde in H-Medium bei 30 °C kultiviert, mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 100) und 25 beziehungsweise 90 Minuten nach Infektion der Einwirkung von 100 µg/ml Rifampicin ausgesetzt. Zu bestimmten Zeiten nach Rifampicin-Zugabe wurde jeweils eine 2-Minuten-"Pulse"-Markierung durchgeführt und das Gen-5-Protein isoliert. Die im Gen-5-Protein gefundene, aus dem "Pulse" stammende, Radioaktivitätsmenge wurde jeweils im Vergleich mit dem internen Standard normalisiert.

Das Experiment wurde zu frühen und späten Zeiten nach M13-Infektion durchgeführt, um unterscheiden zu können, ob eine eventuell nachweisbare, hohe funktionelle Stabilität der M13-spezifischen mRNA als eine spezifische Moleküleigenschaft aufzufassen ist oder ob der Phage die Fähigkeit besitzt, den Abbau seiner eigenen mRNA zu behindern und zu verzögern. Dies könnte beispielsweise geschehen, indem der Phage Nuclease-Inhibitoren codiert oder induziert. Ist die funktionelle Stabilität eine Moleküleigenschaft, sollte kein Unterschied feststellbar sein. Ein stabilisierender Effekt hingegen wäre vermutlich zu späten Zeiten nach Infektion deutlicher erkennbar als zu frühen.

Beide Teile des Experiments (Abbildung 14 A und B) ergaben übereinstimmend für die erste, alleine aussagekräftige, Phase nach Rifampicin-Zugabe eine biologische Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA von etwa 5 Minuten $\pm$ 10 Prozent (entsprechend etwa 8 Prozent der Generationszeit der Bakterien). Diese hinreichende Übereinstimmung bezeugt, daß die M13-Infektion an sich keinen stabilisierenden Effekt auf die M13-spezifische mRNA ausübt.

Der Wert von etwa 5 Minuten biologischer Halbwertszeit liegt etwa 3 - 5mal so hoch wie unter vergleichbaren Bedingungen erarbeitete biologische Halbwertszeiten colispezifischer mRNA (Schwartz et al., 1970; Blundell et al.,

1972). Die funktionelle Stabilität der M13-Gen-5-mRNA ist also bis zu fünfmal größer als die colispezifischer mRNA.

Es stellt sich die Frage, warum die Bestimmung der biologischen Halbwertszeit der M13-Gen-5-mRNA keine einheitliche Kurve ergibt (Abbildung 14 A). Etwa 10 - 12 Minuten nach der Zugabe von Rifampicin scheint sich die mRNA zu stabilisieren. Ein ähnlicher Befund wurde auch von anderen Autoren erhoben (Puga et al., 1973; Blundell et al., 1972). 30 Minuten nach Rifampicin-Zugabe kann sogar noch eine beträchtliche Menge an Synthesekapazität für colispezifische Proteine in der uninfizierten Zelle nachgewiesen werden (Blundell et al., 1972). Dieser Befund ist nicht schlüssig zu erklären. Etwa 10 - 12 Minuten nach Zugabe scheint das Rifampicin Wirkungen auszuüben, die über die Hemmung der Transcription hinausgehen. Der zelluläre Stoffwechsel wird, gleichsam eine lebenserhaltende Reaktion, verlangsamt und die Translation behindert. Die Behinderung der Translation stabilisiert bekanntlich die mRNA (Guthrie, 1971). Allerdings werden von außen zugeführte Aminosäuren offensichtlich noch aktiviert und in Polypeptidketten eingebaut. Der totale Zusammenbruch der Synthesekapazität für Proteine etwa durch freiwerdende Nucleasen und Abbau von Nucleinsäure in der sterbenden Zelle dürfte erst viel später stattfinden.

Es ist interessant, die Kurven der biologischen und physikalischen Halbwertszeiten der M13-spezifischen mRNA miteinander zu vergleichen (Abbildungen 11 und 14). Dies ist nur bedingt möglich, weil im Fall der physikalischen Halbwertszeit die gesamte, M13-spezifische RNA betrachtet wurde, im Fall der biologischen Halbwertszeit hingegen nur die Gen-5-mRNA.

Vergleicht man die Halbwertszeiten, fällt die Rate der Inaktivierung der Gen-5-mRNA etwa mit der initialen Rate der Degradation zusammen (Halbwertszeiten 5 beziehungsweise 6 - 7 Minuten). Es könnte so sein, daß der initiale Schenkel der Degradationskurve (Abbildung 11) die Degr-

dation der inaktivierenden Gen-5-mRNA darstellt.

Bis zur Erhebung weiterer Befunde über biologische Halbwertszeiten M13-spezifischer mRNA-Spezies ist es nicht möglich, den an der M13-Gen-5-mRNA erhobenen Befund zu verallgemeinern. Es kann sein, daß die verschiedenen M13-spezifischen mRNA-Spezies unterschiedliche biologische Halbwertszeiten haben. Es ist ebenso denkbar, daß alle dieselbe biologische Halbwertszeit haben, während sie unterschiedlich zugänglich für Nucleasen sind und unterschiedliche physikalische Halbwertszeiten aufweisen.

Abschließend soll nochmals die Frage aufgeworfen werden, was die außerordentliche Effizienz der phagenspezifischen Genexpression ausmachen könnte.

Aus Abschnitt F.2.1 war festzuhalten, daß die phagenspezifische mRNA höchstens einen Anteil von 10 Prozent an der Gesamt-mRNA in der Zelle hat, während bereits zwei von acht codierten Proteinen zusammen 14 Prozent der zellulären Proteinsynthesekapazität belegen. Aus diesem Abschnitt ergibt sich, daß die Gen-5-mRNA drei- bis fünfmal stabiler ist als colispezifische mRNA.

Vermutlich ist die relativ hohe funktionelle Stabilität der M13-Gen-5-mRNA keine ausreichende Begründung dafür, daß das Gen-5-Produkt in so ungewöhnlich großen Mengen synthetisiert wird. Anzunehmen ist, daß es mehrere Faktoren gibt, die zusammengenommen die Expression des Gens 5 begünstigen. Es könnte sein, daß Gen-5-mRNA bereits bevorzugt synthetisiert wird und dann eine besonders aktive und langlebige Matrize für die Proteinsynthese darstellt. Von diesen verschiedenen Faktoren ist einer wahrscheinlich gemacht worden. Über die anderen Möglichkeiten lassen sich zur Zeit nur Spekulationen anstellen.

3. Molekulargewichtsverteilung M13-spezifischer RNA in AB301-105 und Bestimmung der physikalischen Halbwertszeit

In AB301-105 sind lange RNA-Moleküle nachweisbar, die als Vorläufer der ribosomalen RNA angesehen wurden. Begründet wurde dieser bisher einmalige Befund mit dem Mangel an RNAase III, der diese Zelle kennzeichnet. RNAase III kommt als colispezifisches Reifungsenzym in Frage. Ein Mangel an Reifungsenzym verzögert naturgemäß den Reifungsprozeß. Daher, so vermutete man, sind die in dieser Zelle vorkommenden Vorläufer-Moleküle darstellbar (Einzelheiten und Literaturzitate: vgl. Abschnitt B.3.4).

Es stellt sich die Frage, ob für M13-spezifische RNA in dieser Zelle ähnliche Transcriptionsbedingungen herrschen wie für die ribosomale RNA. In diesem Fall sollten sich M13-spezifische RNA-Moleküle nachweisen lassen, deren Molekulargewicht ein- bis mehrfacher Genomlänge entspricht.

Findet man derartige Überlange, M13-spezifische RNA-Moleküle, muß man sich allerdings darüber im klaren sein, daß die für die ribosomale RNA geltenden Schlußfolgerungen nicht ohne weiteres auf M13-spezifische RNA übertragen werden können.

Schon früher wurde angenommen, daß die verschiedenen Spezies ribosomaler RNA eine Transcriptionseinheit bilden (beispielsweise: Pato und von Meyenburg, 1970). Daß man das einheitliche Transcriptionsprodukt nicht fand, wurde damit erklärt, daß die ribosomale RNA ihren Reifungsprozeß in statu nascendi durchmacht.

Für M13 hingegen ist das Modell einer "Endlos"-Transcription, das weiter oben skizziert wurde, wenig wahrscheinlich (vgl. Abschnitt F.1). Findet man daher Anzeichen für einen derartigen Transcriptionsmodus in AB301-105, muß man vermuten, daß sich in dieser Zelle zwei verschiedene Prozesse überlagern. Zum ersten sind die Transcriptionseinheiten auf Grund mangelhafter Termination ungewöhnlich lang, und zum zweiten findet eine Reifung nur

verzögert und nicht in statu nascendi statt.

Um diese Frage zu prüfen, wurde mit AB301-105 ähnlich wie mit AB301 NTG-Rif^S ein Rifampicin-Experiment durchgeführt. Mit diesem Experiment läßt sich untersuchen: Erstens, ob RNA-Moleküle ein- bis mehrfacher Genomlänge existieren; zweitens, ob diese Moleküle stabil in des-aggregierenden Agentien sind; drittens, ob die überlangen RNA-Moleküle zu kleineren Einheiten reifen; viertens, ob die Synthesedauer für M13-spezifische RNA-Moleküle mit dem Befund der Existenz überlanger RNA vereinbar ist und schließlich, fünftens, ob die verschiedenen Molekulargewichts-Spezies mit unterschiedlichen Halbwertszeiten zerfallen, wie man für einen Reifungsprozeß annehmen sollte.

3.1 Nachweis der Wirksamkeit der verwendeten Rifampicin-Konzentration

Von AB301-105 konnte ein Rifampicin-hypersensitives Derivat nicht hergestellt werden, da man bei einer Mutagenisierung möglicherweise die besonderen Eigenschaften der Mutante aufs Spiel gesetzt hätte (vgl. Abschnitte C.1.2 und E.4). Deshalb ist es in diesem Fall besonders wichtig sicherzustellen, daß die verwendete Rifampicin-Konzentration die RNA-Synthese in der Zelle vollständig inhibiert. Dies wurde in einem Vorversuch geprüft.

Die Verhältnisse des Vorversuchs entsprachen im wesentlichen denen des eigentlichen Experiments (vgl. Abschnitt E.4.2). M13-infizierte AB301-105, in vollsynthetischem H-Medium bei 30 °C kultiviert, wurden 20 Minuten nach Infektion gleichzeitig der Einwirkung von ³H-Uracil und 300 µg/ml Rifampicin ausgesetzt. Alle 20 Sekunden wurden gleich große Proben entnommen und die Zellen lysiert. Das Lysat wurde zum Teil mit TCA gefällt, ein gleich großer Teil wurde mit Alkali behandelt und dann mit TCA gefällt. Aus den jeweils gemessenen Radioaktivitätsmengen ergab sich einmal der Gesamteinbau in Nucleinsäure und zum anderen der Alkali-beständige Anteil an Radioaktivität in der DNA. Die Differenz der beiden Werte entspricht

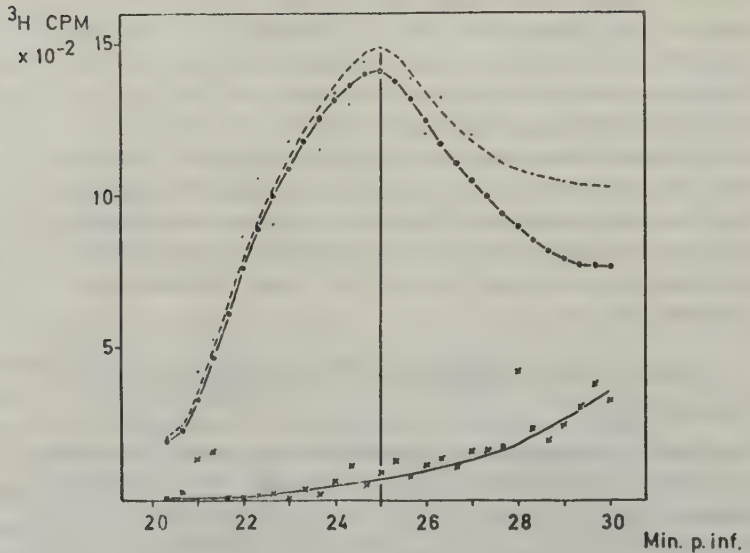


Abb. 15: Vorversuch: Einwirkung von 300 µg/ml Rifampicin auf den RNA-Stoffwechsel in M13-infizierten AB301-105.

Bakterienkultur in vollsynthetischem H-Medium bei 30 °C (vgl. Abschnitt E.4). Infektion mit M13 Wildtyp zum Zeitpunkt 0 Minuten (Infektionsmultiplizität 20). Zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Infektion gleichzeitige Zugabe von 5-³H-Uracil (28 Ci/mM; 10 µCi/ml) und von Rifampicin ad 300 µg/ml. Probenentnahme alle 20 Sekunden: Einpipettieren von 0.4 ml Probe in 1 ml Stop-Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 0.02 M EDTA-Na₂, 0.5 % SDS), erhitzt im kochenden Wasserbad. Von jeder Probe 0.5 ml mit Carrier TCA-gefällt und 0.5 ml in NaOH verdaut (0.3 M, 45 °C, 15 Stunden) und danach TCA-gefällt.

Es ergibt sich ein Profil der Gesamtradioaktivität (gestrichelte Kurve mit kleinen Punkten) und ein Profil der alkaliresistenten Radioaktivität in der DNA (durchgezogene Kurve mit Kreuzchen). Die Differenz der beiden Profile ergibt das Profil der RNA (durchgezogene Linie mit dicken Punkten). Die Radioaktivitätsmenge der RNA erreicht 5 Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum. 300 µg/ml Rifampicin unterbinden die RNA-Synthese in AB301-105 vollständig. Die letzten RNA-Moleküle werden ungefähr 5 Minuten nach Rifampicin-Zugabe fertiggestellt.

dem Anteil an Radioaktivität in der RNA (Abbildung 15).

Es zeigt sich, daß die in die RNA inkorporierte Radioaktivität einige Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum erreicht. Das bedeutet, daß die Initiation von RNA-Molekülen bei der angewandten Rifampicin-Konzentration vollständig gehemmt wird, während initiierte Moleküle fertiggestellt werden.

Die Inkorporation von Radioaktivität in die RNA wird länger fortgesetzt als das in AB301 NTG-Rif^S der Fall ist (vgl. Tabelle 1): In AB301 NTG-Rif^S wird bereits etwa 3 Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum erreicht, in AB301-105 aber erst etwa 5 Minuten nach Rifampicin-Zugabe.

Dieser Befund ist mehrdeutig. Erstens könnte die Rifampicin-Wirkung auf Grund erschwerter Permeation der Zellwand verspätet eingetreten sein. Zweitens könnte die Syntheserate für RNA-Moleküle in AB301-105 kleiner sein als in AB301 NTG-Rif^S. Dies ließe sich erklären durch die etwa 50 Prozent höhere Generationszeit von AB301-105 (vgl. Abbildungen 1 und 9); die beträgt bei AB301 NTG-Rif^S in dem verwendeten Medium 60 Minuten und bei AB301-105 etwa 90 Minuten. Drittens könnten in AB301-105 generell längere Polynucleotidketten synthetisiert werden. Daß diese Annahme die wesentlichste und wahrscheinlichste ist, zeigt die folgende Darstellung der experimentellen Ergebnisse.

3.2 Molekulargewichtsverteilung der RNA in AB301-105

Die experimentellen Einzelheiten wurden in Abschnitt E.4.2 beschrieben. Eine Kultur von AB301-105 in vollsynthetischem H-Medium (Generationszeit etwa 85 Minuten; vgl. Abbildung 9) wurde mit M13 Wildtyp infiziert. 2 3/4 Stunden später wurde Radioaktivität hinzugegeben, zwei Minuten danach Rifampicin ad 300 µg/ml. Proben wurden 3, 5, 8, 11, 13, 23 und 33 Minuten nach Zugabe der Radioaktivität (beziehungsweise 1, 3, 6, 9, 11, 16, 21 und 31 Minuten nach Zugabe des Rifampicins) entnommen. Die RNA von allen Proben wurde gereinigt, auf Gelen fraktioniert, fraktionenweise eluiert und gegen denaturierte M13-RF-DNA hybridisiert. Bestimmt wurden die Profile der Gesamtradioaktivität und der M13-spezifischen, hybridisierten Radioaktivität. Die Gesamtradioaktivität jeder Fraktion wurde folgendermaßen errechnet: Wie bei dem Experiment mit AB301 NTG-Rif^S wurde die Radioaktivitätsmenge aus einem Aliquot des Eluats bestimmt und auf den in die Hybridisationsreaktion eingesetzten Anteil des Eluats hochgerechnet. Die Gesamtradioaktivität entspricht daher der in die Hybridisationsreaktion eingesetzten Radioaktivitätsmenge (Abbildung 16).

Zunächst soll die Molekulargewichtsverteilung der ribosomalen RNA in AB301-105 betrachtet werden, da die hier zu erwartenden Resultate bekannt sind.

An der Synthese der zellulären RNA hat die ribosomale RNA stets den größten Anteil. Der Einbau von Radioaktivität in ribosomale RNA bestimmt im wesentlichen das Brutto-Profil der RNA-Synthese-Kinetik (vgl. Abbildung 15). Das Profil der Gesamtradioaktivität erlaubt daher Aussagen über ribosomale RNA (Abbildung 16, obere Reihe).

In Abbildung 16, mittlere Reihe, ist das Radioaktivitätsprofil des internen Standards wiedergegeben. Die Positionen der Peaks des internen Standards entsprechen der reifen, ribosomalen RNA.

Ein Vergleich der beiden Profile zeigt, daß sich kurze Zeit nach Rifampicin-Zugabe RNA-Moleküle nachweisen lassen, deren Molekulargewichte erheblich über denen der

reifen, ribosomalen RNA liegen (Abbildung 16, Probe 3 Minuten, oberes und mittleres Profil). Die größte Spezies hat ein Molekulargewicht von etwa 2.2×10^6 d. Sie entspricht dem einheitlichen Vorläufermolekül der ribosomalen RNA (Nikolaev et al., 1973; Nikolaev und Schlessinger, 1974). Daneben existieren weitere Molekulargewichts-Spezies im hochmolekularen Bereich, die verschiedene Intermediärprodukte der Reifung zu 23s- und 16s-rRNA repräsentieren.

Einige Minuten später ist der Anteil von Molekülen, die von den Positionen der reifen, ribosomalen RNA abweichen, stark zurückgegangen, während der Anteil der RNA in den Positionen der reifen, ribosomalen RNA stark zugenommen hat (Abbildung 16, Proben 13 und 23 Minuten). Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei den genannten überlangen RNA-Spezies um Vorläufermoleküle der ribosomalen RNA handelt.

Abb. 16: Colispezifische und M13-spezifische RNA in AB301-105.

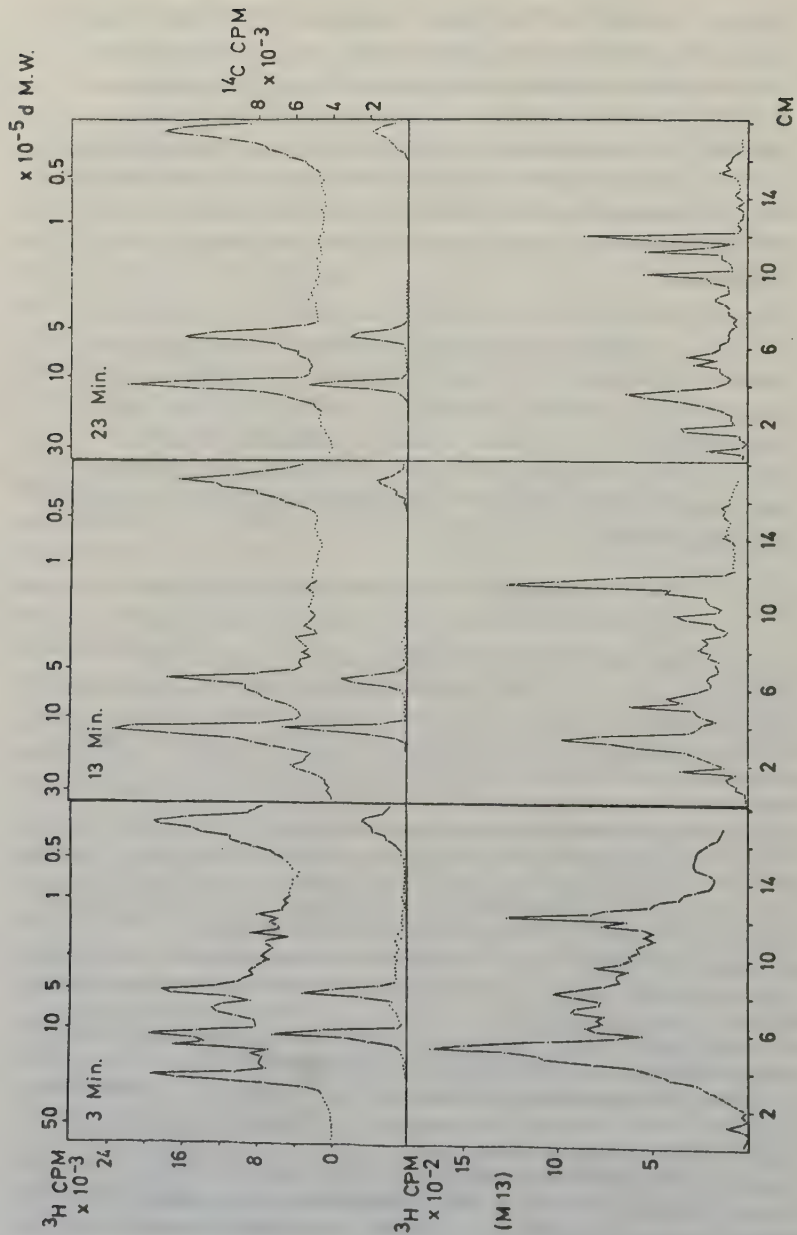
2 3/4 Stunden nach Infektion mit M13 Wildtyp Zugabe von Radioaktivität, 2 Minuten später Zugabe von Rifampicin. Probenentnahme 3, 5, 8, 11, 13, 18, 23 und 33 Minuten nach Zugabe der Radioaktivität. Aufarbeitung der RNA. Weitere experimentelle Einzelheiten im Abschnitt E.4.2. Die Abbildung zeigt die Radioaktivitätsprofile von drei der Proben. Obere Reihe: Profile der Gesamtradioaktivität beziehungsweise der Menge der pro Fraktion in die Hybridisationsreaktion eingesetzten Radioaktivität. Mittlere Reihe: Radioaktivitätsprofile der RNA des internen Standards (den Positionen der reifen, ribosomalen RNA entsprechend). Untere Reihe: Radioaktivitätsprofile der hybridisierten, M13-spezifischen RNA.

Die Abbildung erläutert drei, im Abschnitt F.3 dargestellte, Hauptbefunde:

1. Es existieren Vorläufermoleküle der ribosomalen RNA; die größte Spezies hat ein Molekulargewicht von 2.2×10^6 d. Die Vorläufermoleküle zerfallen rasch (obere Reihe). Im Maß des Zerfalls nimmt die Radioaktivitätsmenge in den Positionen der reifen, ribosomalen RNA zu.

2. Es existiert überlange, M13-spezifische RNA. Ein Peak des Molekulargewichts 1.4×10^6 d (80 % der Genomlänge) tritt besonders hervor, es finden sich aber auch Moleküle bis zu 5×10^6 d. Daneben dominieren Molekulargewichts-Spezies von weniger als 10^6 d (untere Reihe).

3. Die überlangen, M13-spezifischen RNA-Moleküle reifen nicht zu kleineren Molekulargewichts-Spezies. Moleküle aller Molekulargewichts-Klassen scheinen simultan abgebaut zu werden.



Die Probe 13 Minuten enthält noch geringe Mengen RNA der Molekulargewichts-Spezies 2.2×10^6 d (Abbildung 16). Führt man eine Desaggregationskontrolle durch, das heißt, fraktioniert man die RNA der Probe in Gegenwart von Formamid, läßt sich die überlange RNA-Spezies nicht mehr nachweisen (Abbildung 17, obere Reihe). Anscheinend ist das Vorläufermolekül zum Zeitpunkt der Probenentnahme bereits geschnitten gewesen. Es zerfällt nun in Gegenwart von Formamid. Dieser Befund läßt sich mit einem Modell der Molekülreifung vereinbaren, bei dem zunächst ein Schnitt der Polynucleotidkette im Bereich einer Schlinge angenommen wird. Als Folge des Schnittes entsteht ein Aggregat, das in desaggregierenden Agentien zerfällt (vgl. Abschnitt B.3.4).

Bezüglich der ribosomalen RNA ergeben sich die erwarteten Befunde. Wie verhält es sich mit der M13-spezifischen RNA in AB301-105?

Kurz nach Rifampicin-Zugabe findet sich M13-spezifische RNA in allen Molekulargewichtsbereichen (Abbildung 16, Probe 3 Minuten, untere Reihe). Im Vergleich zu dem in AB301 NTG-Rif^S erhobenen Befund existieren in AB301-105 ungewöhnlich lange M13-spezifische Moleküle. Neben einer vorherrschenden Molekulargewichts-Spezies von 1.4×10^6 d (entsprechend etwa 80 Prozent der Genomlänge) findet man M13-spezifische RNA von mehreren Millionen Daltons Molekulargewicht. Bei diesen äußerst hochmolekularen Spezies handelt es sich nicht etwa um DNA: Eine Kontrolle ergab, daß die gesamte Radioaktivität der meniscusnahen Bereiche aller Gele in Alkali labil ist, also keine DNA enthält.

Neben den überlangen existieren in AB301-105 kleinere M13-spezifische RNA-Moleküle von weniger als 10^6 d Molekulargewicht. Diese Moleküle machten in AB301 NTG-Rif^S den überwiegenden Teil aus. Vergleicht man die Profile der M13-spezifischen RNA in den Bereichen zwischen 10^6 und 4×10^4 d Molekulargewicht aus AB301 NTG-Rif^S und AB301-105, wird die Ähnlichkeit deutlich (Abbildungen 10 und 16).

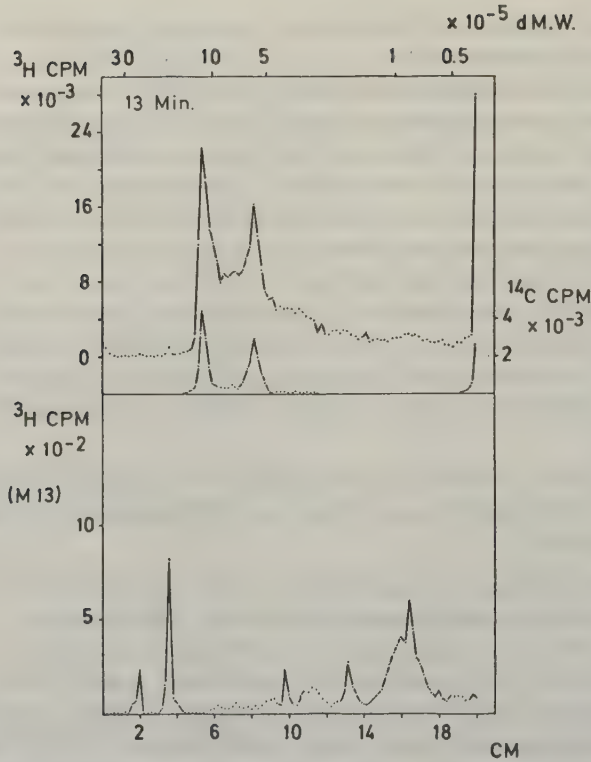


Abb. 17: RNA der Probe 13 Minuten (vgl. Abbildung 16). Desaggregationskontrolle. Fraktionierung auf einem 3.5 %-Acrylamid-0.5 %-Methylenbisacrylamid-Gel in Formamid (Staynov et al., 1972).

Das Vorläufermolekül der ribosomalen RNA vom Molekulargewicht 2.2×10^6 zerfällt bei der Kontrolle, obwohl es auf dem gewöhnlichen Gel noch nachgewiesen werden kann (vgl. Abbildung 16): Es scheint bereits von Reifungsenzym geschnitten zu sein.

Die überlange, M13-spezifische RNA hält der Kontrolle stand. Es zeigen sich Molekulargewichts-Spezies von 1.7×10^6 und 2.8×10^6 . Bei der RNA-Spezies von 1.7×10^6 d Molekulargewicht könnte es sich um dieselbe Molekülklasse handeln, die im gewöhnlichen Gel ein Molekulargewicht von 1.4×10^6 d zeigt: Sie wird unter den denaturierenden Bedingungen des Formamidgels stärker aufgefaltet und läuft möglicherweise elektrophoretisch mit geringerer relativer Mobilität.

Ein beträchtlicher Teil der M13-spezifischen RNA ist bereits so weitgehend nucleolytisch geschnitten, daß er aus dem Formamidgel verschwindet.

Derartige Vergleiche sind allerdings, wie auch schon in Abschnitt F.1.3 ausgeführt wurde, nur pauschal möglich; denn die aus Zellen isolierte, M13-spezifische RNA hat keine derart präzise definierten Molekulargewichtsspezies aufzuweisen wie die ribosomale RNA.

Daher beschränken sich die qualitativen Untersuchungen dieses und die quantitativen Untersuchungen des folgenden Abschnitts vornehmlich auf die Hauptgruppen M13-spezifischer RNA in AB301-105, die überlangen Moleküle von mehr als 10^6 d und die kurzen Moleküle von weniger als 10^6 d Molekulargewicht. Deren Beziehung zueinander ist von größerer Bedeutung für einen möglichen Reifungsprozeß als das Verhalten einzelner, nicht immer reproduzierbarer, Molekulargewichtsspezies.

Um eine Reifung der M13-spezifischen RNA analog der ribosomalen RNA feststellen zu können, müßte sich nachweisen lassen, daß die überlangen Moleküle innerhalb weniger Minuten nach Rifampicin-Zugabe zerfallen, während die Masse der kleinen Moleküle zunimmt.

Bei den Vorläufermolekülen der ribosomalen RNA ist, wie erwähnt, die rasch ablaufende Reifung deutlich erkennbar. Ein ähnlicher Prozeß ist bei der M13-spezifischen RNA nicht festzustellen. Die überlangen Moleküle zerfallen keineswegs mit zunehmender Zeit nach Rifampicin-Zugabe, sie treten im Gegenteil deutlicher hervor, was darauf schließen läßt, daß die Elongation M13-spezifischer Polynucleotidketten noch andauert (Abbildung 16, Proben 13 und 23 Minuten).

Vorläufer-Moleküle der ribosomalen RNA waren 13 Minuten nach Rifampicin-Zugabe nur noch in geringen Mengen, in Gegenwart von Formamid schon gar nicht mehr nachweisbar.

Die analoge Desaggregationskontrolle der M13-spezifischen RNA zeigt, daß 13 Minuten nach Rifampicin-Zugabe durchaus noch überlange, in Formamid stabile Moleküle existieren (Abbildung 17, untere Reihe).

Die Desaggregationskontrolle belegt die reale Existenz überlanger, M13-spezifischer Polyribonucleotidketten in

AB301-105 und zeigt außerdem, daß diese Ketten offenbar nicht mit derselben Halbwertszeit zerfallen wie die Vorläufer der ribosomalen RNA, demnach also wohl nicht reifen. Die Molekulargewichte der in Formamid stabilen RNA-Spezies lassen sich nicht genau angeben. Denaturierung verändert die elektrophoretischen Eigenschaften einer RNA beträchtlich, so daß vor allem ein Vergleich mit nicht denaturierenden Gelen nicht immer möglich ist.

3.3 Synthese- und Abbaukinetik der RNA in AB301-105

Um die aus den Profilen gewonnenen Eindrücke mit Zahlen zu untermauern, wurden ähnlich wie bei dem Experiment mit AB301 NTG-Rif^S quantitative Untersuchungen angestellt. In die Kalkulationen wurden alle Fraktionen einbezogen, die Molekulargewichte bis zu 4×10^4 d hinunter repräsentieren. Addiert wurden jeweils die ³H-counts der Gesamtradioaktivität und die der M13-spezifischen, hybridisierten Radioaktivität. Die Summen wurden jeweils im Vergleich zum internen Standard normalisiert. Die errechneten Daten wurden in Tabelle 2 zusammengestellt.

Die Gesamtradioaktivität erreicht etwa drei Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum. Bis zum Zeitpunkt 6 Minuten nach Rifampicin-Zugabe findet kein wesentlicher Abbau statt, ein solcher wird erst zwischen 6 und 9 Minuten nach Rifampicin-Zugabe erkennbar. Dies deutet darauf hin, daß der tatsächliche Zeitpunkt für das Maximum zwischen 3 und 6 Minuten nach Rifampicin-Zugabe anzusetzen ist. Zum Vergleich: Bei dem Vorversuch, bei dem lediglich die Gesamtradioaktivität in der RNA zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen worden war, ergab sich ein Maximum etwa 5 Minuten nach Rifampicin-Zugabe (vgl. Abbildung 15).

Bei der Beurteilung des Verlaufs von Synthese und Abbau von RNA in Gegenwart von Rifampicin ist zu berücksichtigen, daß zum Zeitpunkt des Eintritts der Rifampicin-Wirkung der Anteil gerade initiierteter Polynucleotidketten klein ist. Deren Elongation überlagert sich mit dem Abbau colispezifischer mRNA, der rasch erfolgt. Durch diese

Probe: Min. nach ³ H RIF	Gesamt-RNA %	M13-RNA %	M13-RNA > 10 ⁶ (%)
3	545 900	96.7	31.1
5	564 500	100.0	31.0
8	558 300	98.9	32.1
11	511 000	90.5	29.2
13	439 700	77.9	31.6
18	308 200	54.6	30.4
23	257 400	45.6	30.9
33	230 300	40.8	33.3

Tabelle 2: Synthese und Abbau der Gesamt-RNA und der hybridisierten, M13-spezifischen RNA aus AB301-105. Radioaktivität (³H) wurde 2 3/4 Stunden nach Infektion mit M13 zugegeben, Rifampicin 2 Minuten später. In die Kalkulation wurden alle Fraktionen, die Molekulargewichte bis hinunter zu 4 x 10⁴ d repräsentierten, einbezogen. Die ³H-counts der Gesamtradioaktivität und der hybridisierten, M13-spezifischen Radioaktivität wurden addiert und im Vergleich zum internen Standard normalisiert. Für jede Probe wurde darüber hinaus der Anteil der hybridisierten Radioaktivität in Fraktionen errechnet, die Molekulargewichte über 10⁶ d repräsentierten.

Überlagerung von Synthese und Abbau wird das Radioaktivitätsmaximum breit und um so breiter, je heterogener die zuletzt initiierte Population von Molekülen ist. Hier scheint ein Unterschied zwischen AB301 NTG-Rif^S und AB301-105 zu bestehen. Bei AB301 NTG-Rif^S ließ sich der Zeitpunkt, zu dem das Radioaktivitätsmaximum erreicht wurde, verhältnismäßig genau feststellen (vgl. Tabelle 1). Bei AB301-105 ist dieser Zeitpunkt nur sehr unscharf markiert, die Population von RNA-Molekülen scheint in AB301-105 besonders heterogen zu sein. Auf diese Feststellung soll in der Schlußbetrachtung nochmals eingegangen werden.

Die hybridisierte, M13-spezifische Radioaktivität erreicht etwa 6 Minuten nach Rifampicin-Zugabe ein Maximum. Die längsten, in AB301-105 synthetisierten Polyribonucleotidketten sind offenbar die M13-spezifischen. Daher besteht auch Grund zu der Annahme, daß die längsten, M13-spezifischen RNA-Moleküle länger sind als das Vorläufermolekül der ribosomalen RNA vom Molekulargewicht 2.2×10^6 d.

Aus der Abbaukinetik der M13-spezifischen RNA läßt sich eine physikalische Halbwertszeit von etwa 14 - 15 Minuten errechnen. Dies ist in etwa die physikalische Halbwertszeit des größten Teils der M13-spezifischen RNA in AB301 NTG-Rif^S (vgl. Abschnitt F.1.3).

Der Anteil überlanger Moleküle von mehr als 10^6 d Molekulargewicht beträgt, wie aus Tabelle 2 hervorgeht, überraschenderweise konstant etwa 30 Prozent der Gesamtpopulation M13-spezifischer Moleküle, und zwar unabhängig vom zeitlichen Abstand zwischen Rifampicin-Zugabe und Probenentnahme. Daraus ergibt sich zwingend, daß die gesamte, M13-spezifische RNA in AB301-105 simultan abgebaut wird. Soweit sich das innerhalb der Fehlergrenzen der aufwendigen Methodik feststellen läßt, findet keine Reifung von überlangen zu kleineren RNA-Molekülen statt.

4. Schlußbetrachtung

Die Molekulargewichtsverteilung M13-spezifischer RNA in AB301 NTG-Rif^S unterscheidet sich grundlegend von der in AB301-105. In AB301 beziehungsweise in AB301 NTG-Rif^S finden sich lediglich Moleküle von weniger als 10^6 d Molekulargewicht; scheinbar längere RNA-Ketten sind definitiv Aggregationsartefakte (Jacob et al., 1973; Abschnitt F.1).

Hingegen wurden in AB301-105 M13-spezifische Moleküle ein- bis mehrfacher Genomlänge nachgewiesen. Sie finden sich in dieser Zelle neben den ebenfalls in AB301 existierenden kleineren Molekülen. Die reale Existenz der überlangen Moleküle wurde durch Desaggregationsstudien und durch Betrachtungen zur Synthesekinetik wahrscheinlich gemacht. Die überlangen Moleküle sind jedoch keine Vorläufer für M13-spezifische mRNA. Sie scheinen ein Eigenleben zu führen. Demnach trifft auch für AB301-105 das bereits skizzierte Modell einer "Endlos"-Transcription nicht zu. Überlange, M13-spezifische RNA-Moleküle werden in AB301-105 zwar synthetisiert, eine Reifung in statu nascendi oder verzögert im Anschluß an die Transcription findet jedoch nicht statt.

Es ergibt sich die Frage, wie diese überlangen Moleküle entstehen und welche Bedeutung ihnen zukommt.

Fraglich ist, ob die überlangen, M13-spezifischen Moleküle biologisch aktiv sind. Diese Frage läßt sich zur Zeit nicht direkt beantworten. Immerhin reproduziert sich M13 in AB301-105 erheblich schlechter als in AB301 NTG-Rif^S (vgl. Abbildungen 1 und 9). Der Grund dafür könnte darin zu sehen sein, daß ein Teil der M13-spezifischen Transcriptionsprodukte unbrauchbar - weil zu lang - ist und auch nicht reifen kann.

Vorläufermoleküle ribosomaler RNA in AB301-105 hingegen scheinen reifen zu können. Dies bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß der Weg zu ribosomaler RNA in jedem Fall über das Vorläufermolekül führt. Kürzlich wurden Daten publiziert, die darauf hindeuten, daß überlange Vorläufermoleküle nur einen Teil der Transcriptionsprodukte

repräsentieren, aus denen die reife, ribosomale RNA entsteht (Gegenheimer und Apirion, 1975). Es scheint sich so zu verhalten, daß die langen Vorläufermoleküle der ribosomalen RNA Produkte eines irregulären Stoffwechselweges sind; aus den überlangen Produkten schneidet sich die Zelle funktionstüchtige Moleküle zurecht. Das Zurechtschneiden ist demnach eher als Ausweg denn als physiologischer Weg der Synthese ribosomaler RNA zu betrachten.

Die von Apirion vermutete Heterogenität bei der Entstehung ribosomaler RNA deckt sich mit dem Ergebnis der Betrachtungen in Abschnitt F.3 zur Synthesekinetik in Gegenwart von Rifampicin. Dort wurde gesagt, daß der Terminationszeitpunkt um so unschärfer markiert ist und das Radioaktivitätsmaximum um so breiter ausfällt, je heterogener die Molekulargewichte der synthetisierten RNA sind. Da die Synthese ribosomaler RNA mehr als die Hälfte der Gesamtsynthese ausmacht, bezieht sich das Maximum der Gesamtradioaktivität in erster Linie auf die Termination der ribosomalen RNA. Da das Radioaktivitätsmaximum in AB301-105 ungewöhnlich breit ist, muß man schließen, daß in dieser Zelle unterschiedlich lange Vorläufermoleküle der ribosomalen RNA synthetisiert werden. Anscheinend hat nur ein Teil der Vorläufermoleküle in AB301-105 das Molekulargewicht 2.2×10^6 d - dieser Teil terminiert zuletzt -, während für den überwiegenden Teil dieselbe Synthesekinetik gilt, die auch in AB301 NTG-Rif^S beobachtet werden konnte, mit einem Maximum der Gesamtradioaktivität etwa 3 Minuten nach Rifampicin-Zugabe (vgl. Tabelle 1).

Die Tatsache, daß überlange, M13-spezifische Moleküle in AB301-105 nicht reifen, stützt die Annahme eines partiell irregulären Stoffwechselweges.

Irregularität bedeutet: übermäßig lange Transcriptionseinheiten, eventuell auf Grund mangelhafter Termination. In der Mehrzahl der Fälle scheint die Termination zu funktionieren, die primären Transcriptionsprodukte haben normale Kettenlängen wie in AB301 NTG-Rif^S. In etwa 30 Prozent der Fälle versagt jedoch die Termination: Die M13-

spezifischen Transkriptionsprodukte in AB301-105 werden überlang. Für M13-spezifische RNA gibt es dann jedoch keine Möglichkeit mehr zu reifen.

Über die Ursachen für dieses Phänomen lassen sich zahlreiche Spekulationen anstellen. Einige der möglichen Ursachen wurden bereits ausgeschlossen.

AB301-105 besitzt normale Mengen des in vitro wirksamen Terminationsfaktors "rho" (Roberts, 1969), so daß eine mangelhafte "rho"-Termination als Ursache unwahrscheinlich ist (Portmann und Wanner, 1974; nicht publiziertes Resultat).

In *E. coli* wurden Dimere der viralen DNA filamentöser Phagen (Wheeler et al., 1974) und Dimere der M13-RF-DNA (Jaenisch et al., 1969) nachgewiesen. Dimere der M13-RF-DNA könnten möglicherweise als Matrize für die Transcription überlanger RNA fungieren. Derartige Moleküle kommen jedoch in AB301-105 nicht häufiger vor als in anderen Zellen. Auf keinen Fall machen sie 30 Prozent der RF-Population aus (Wanner und Delius, 1975; nicht publiziertes Resultat).

5. Praktikable, weiterführende Experimente

AB301-105 verdient Interesse als ein System mit partiell defekter Terminationsfunktion. Diese Mutante eröffnet einen Weg, die für eine geordnete Termination verantwortlichen Prozesse und Faktoren zu analysieren. Untersuchungen dazu sind im Gange. Dabei könnte sich allerdings störend auswirken, daß die Zelle den Defekt partiell korrigiert. Es ist jedoch sehr zweifelhaft, ob eine Zelle mit totalem Ausfall der Terminationsfunktion existieren könnte.

Die Existenz überlanger, M13-spezifischer RNA in AB301-105 bietet die Möglichkeit, erstmals in vivo synthetisierte RNA von M13 zu isolieren. Im Molekulargewichtsbereich oberhalb 10^6 d befindet sich keine colispezifische mRNA. Betrachtet man die Profile aus AB301-105, kommt man zu dem Schluß, daß auch in dieser Zelle überlange colispezifische mRNA kaum in nennenswerten Mengen existiert. Sollte sie existieren, wäre sie vermutlich nicht so stabil wie M13-spezifische RNA. Die M13-spezifische RNA aus AB301-105 könnte daher relativ leicht abgetrennt werden. Man könnte feststellen, ob die überlangen Moleküle biologisch aktiv sind oder nicht, indem man ihre Matrizen-Funktion in einem in-vitro-Translati-onssystem testet.

G. Materialien und Standardtechniken

1. Bakterien- und Phagenstämme

Escherichia coli K12 AB301 stammt von Gesteland (Gesteland, 1966). Escherichia coli K37 und K38 stammen von Zinder (Zinder und Cooper, 1964). Escherichia coli K12 AB301-105 stammt aus dem eigenen Labor (Kindler et al., 1973). Escherichia coli K12 AB301 NTG-Rif^S stammt ebenfalls aus dem eigenen Labor (vgl. Abschnitt D.1).

M13 Wildtyp stammt aus dem eigenen Labor. M13-am5-H3 stammt von Pratt (Pratt et al., 1966).

2. Kulturmedien

CW-Medium:

Enthält in einem Liter: 30 g Caseinhydrolysat, technisch (Difco); 20 g Glyzerin (87 %ig, DAB7); 1 g Yeast extract (Difco); 1 g MgSO₄·7H₂O. Der pH wird mit Natronlauge auf 7.6 eingestellt, danach wird das Medium 30 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert.

H-Medium (modifiziert nach Maaløe und Hanawalt, 1961):

H-Medium besteht aus H-Salz-Gemisch mit wechselnden Zusätzen. Das H-Salz-Konzentrat (10fach) enthält in 100 ml: 12.1 g Tris; 2 g KCl; 2 g NH₄Cl; 0.5 g MgCl₂·6H₂O; 0.33 g Na₂SO₄; der pH wird mit Salzsäure auf 7.4 eingestellt.

H-Medium zur ³H-Thymidin-Markierung von M13-RF-DNA enthält in 50 ml: 5 ml H-Salz-Konzentrat; 1 g Caseinhydrolysat, technisch (Difco); 1 g Glyzerin; 50 µl einer 0.1-molaren, wäßrigen CaCl₂-Lösung; 1 ml eines 0.1-molaren Phosphatpuffers, eingestellt auf pH 7.2; 5 mg Desoxyadenosin. Der pH wird auf 7.2 nachjustiert und das Medium 30 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert.

H-Medium zur ³H-Uracil-Markierung von RNA in AB301 NTG-Rif^S enthält in 100 ml: 10 ml H-Salz-Konzentrat; 1 g Glucose; 100 µl einer 0.1-molaren, wäßrigen CaCl₂-Lösung; 2 ml eines 0.1-molaren Phosphatpuffers, eingestellt auf

pH 7.2; 0.2 g Caseinhydrolysat (Difco), davon 3/4 vitaminfrei, 1/4 technisch. Der pH wird auf 7.2 nachjustiert und das Medium 30 Minuten lang bei 120 °C autoklaviert.

H-Medium zur ³H-Leucin- bzw. ¹⁴C-Leucin-Markierung von Proteinen in K37, K38 und AB301 NTG-Rif^s, sowie zur Herstellung von M13-Phagen, deren Proteinhülle markiert ist, enthält in 100 ml: 10 ml H-Salz-Konzentrat; 1 g Glucose; 100 µl einer 0.1-molaren, wäßrigen CaCl₂-Lösung; 2 ml eines 0.1-molaren Phosphatpuffers, eingestellt auf pH 7.2; 5 mg der L-Form jeder Aminosäure bzw. 10 mg des Racemats; 1 mg L-Leucin; 10 mg Desoxyadenosin; 2 mg Uracil. Der pH wird auf 7.4 nachjustiert. Das Medium wird zur Sterilisation durch ein Millipore-Nitrocellulose-Filter der durchschnittlichen Porengröße 0.2 µm filtriert.

H-Medium zur Markierung von RNA in AB301-105 enthält in 100 ml: 10 ml H-Salz-Konzentrat; 1 g Glucose; 1 g Glyzerin; 100 µl einer 0.1-molaren, wäßrigen CaCl₂-Lösung; 2 ml eines 0.1-molaren Phosphatpuffers, eingestellt auf pH 7.2; 5 mg der L-Form jeder der 20 Aminosäuren bzw. 10 mg des Racemats; 10 mg Desoxyadenosin; 1 ml eines 100fach-Konzentrats von Vitaminen für Eagle's Minimum Essential Medium (Flow Laboratories; Endkonzentration zwischen 0.1 und 2.0 mg/l). Der pH wird auf 7.4 nachjustiert. Das Medium wird zur Sterilisation durch ein Millipore-Nitrocellulose-Filter der durchschnittlichen Porengröße 0.2 µm filtriert.

3. Messung der Bakterienkonzentration

Die Bakterienkonzentration wurde in einer Thoma-Zählkammer (Schichtdicke 0.02 mm) mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bestimmt.

4. Messung der Konzentration infektiöser Phagen

Die Phagensuspension wird schrittweise jeweils 1:10 in 0.1-molaren Phosphatpuffer pH 7.2 verdünnt. 0.1 ml jeder Verdünnungsstufe werden mit 0.2 ml einer frischen Kultur von AB301 in CW-Medium in eine sterile Petrischale gegeben.

ben und mit 10 ml CW-Agar (CW-Medium mit 1 % Agar von Difco) von 45 °C vermischt. Die Petrischale wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien bilden einen Rasen, in dem die für M13 charakteristischen, trüben Plaques erkennbar werden. Jede Plaque entspricht einem infektiösen Partikel der Phagenverdünnung. Der Phagentiter wird üblicherweise als "plaque forming units" pro Milliliter (pfu/ml) angegeben.

5. Herstellung ^{14}C -Leucin-markierter M13-Phagen

M13-Phagen, deren Proteinhülle mit ^{14}C -Leucin markiert war, wurden als Referenz benötigt (vgl. Abschnitt F.2.1). E. coli K38 wurden bei 37 °C in modifiziertem H-Medium kultiviert (siehe oben), bei einem Bakterientiter von 2×10^8 /ml mit M13 Wildtyp infiziert (Infektionsmultiplizität 20) und mit $2 \cdot 10^{-4}$ C-L-Leucin (46 mCi/mM; 0.5 µCi/ml) versetzt. Die Kultur wurde zwei Stunden fortgesetzt (vgl. Abschnitt E.2). Dann wurden die Bakterien durch niedrigtourige Zentrifugation abgetrennt und die M13-Phagen aus dem Überstand mit Hilfe von Polyaethylenglykol ausgefällt (Yamamoto et al., 1970). Die radioaktiv markierten M13-Phagen wurden durch drei Zyklen von sedimentierender und Gleichgewichtszentrifugation über CsCl-Gradienten gereinigt (Henry und Pratt, 1969).

6. Radioaktivitätsbestimmungen

TCA-Fällung:

Die Probe wird in 5 ml 10 %iger TCA von 0 °C pipettiert. 20 Minuten später wird die TCA durch ein Millipore-Nitrocellulose-Filter der durchschnittlichen Porengröße 0.6 µm filtriert. Das Filter wird mit weiteren 10 ml TCA gewaschen und dann 10 Minuten lang bei 180 °C im Trockenschrank getrocknet. Das Filter wird in ein Szintillationsröhrchen mit 5 ml Toluolszintillator gegeben und die Zahl der "counts per minute" in einem Szintillationszähler gemessen. Der Szintillator enthält in 2.5 Litern Toluol 12.5 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 0.75 g Dimethyl-POPOP (1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyl-Oxazolyl)-Benzol).

Der Toluolszintillator erfordert absolut wasserfreie Proben. Ist die Trocknung einer Probe nicht möglich, kann zur Szintillationsmessung Kinard's Reagens benutzt werden, das Szintillationsmessungen noch in Gegenwart von 10 Prozent seines Volumens an Wasser erlaubt. Kinard's Reagens hat folgende Zusammensetzung: 0.5 l Xylol, 0.5 l Dioxan, 0.3 l absolutes Aethanol (vergällt), 104 g Naphthalin, 6.5 g PPO und 0.065 g NPO (2-(alpha-Naphthyl)-5-phenyloxazol).

Bestimmung der spezifischen Radioaktivität einer radioaktiv markierten Nucleinsäure:

Eine Probe der Nucleinsäure wird mit TCA gefällt und die Zahl der cpm bestimmt. Eine gleich große Probe wird mit Wasser auf 1 ml Gesamtvolumen verdünnt und die Extinktion bei 260 m μ gegen Wasser als Referenz gemessen. Bei einer Schichtdicke von 10 mm entspricht 1 O.D.₂₆₀ 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA, 36 μ g/ml einzelsträngiger DNA und 42 μ g/ml überwiegend einzelsträngiger RNA. Die spezifische Radioaktivität wird als cpm/ μ g angegeben.

7. Herstellung alkalischer Saccharose (Jaenisch et al., 1969) für alkalische Gradienten

250 ml alkalischer Saccharose 30 % w/v enthalten:

75 g Saccharose (Mann); 25 ml Salzlösung (3 M/l NaCl und 20 mM/l EDTA-Na₂, pH 7.0); 57.8 ml 2 n NaOH (frisch); 4.7 ml 2 M/l Glycin (frisch); H₂O ad 250 ml.

250 ml alkalischer Saccharose 10 % w/v enthalten:

25 g Saccharose (Mann); 25 ml Salzlösung wie oben; 35 ml 2 n NaOH; 15 ml 2 M/l Glycin; H₂O ad 250 ml.

Die genannten Mengen sind kritisch. Alkalische Saccharose muß jeweils frisch angesetzt werden, die fertige Lösung darf nicht warm werden. Der bei der genannten Mischung eingestellte pH beträgt im gesamten Gradienten 12.4. Bei genauer Anwendung der Rezeptur wird M13-RF-DNA im alkalischen Gradienten reversibel denaturiert.

8. Herstellung von Acrylamidgelen mit Harnstoff und SDS zur Elektrophorese von Proteinen

50 ml Lösung enthalten: 6 g rekristallisiertes Acrylamid; 0.1 g rekristallisiertes Methylenbisacrylamid; 12 g Harnstoff ultrarein (Mann); 5 ml 1 M/l Natriumphosphatpuffer pH 7.2; Wasser. Die Lösung wird in einer Vakuumflasche mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Dann werden 80 μ l TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylaethylendiamin, Fluka) und 500 μ l einer 10 %igen wäßrigen Natriumperoxodisulfatlösung zugegeben. Die Lösung wird gemischt und rasch in Gelröhrchen gefüllt. Der Meniscus wird vorsichtig mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation dauert etwa 2 Stunden.

Der entsprechende Elektrophoresepuffer enthält: 0.1 M/l Natriumphosphat pH 7.2, 0.1 % SDS, 4 M/l Harnstoff p.A. und 0.01 % 2-Mercapto-aethanol.

9. Abschließende Reinigung von M13-RF-DNA zur Hybridisation

RF-DNA, die zur Hybridisation benutzt werden soll, muß absolut proteinfrei sein. Die über die Sepharose-Säule und über alkalische Saccharose-Gradienten gereinigte DNA wird daher abschließend phenolisiert.

Die DNA wird zunächst gegen einen dünnen Puffer dialysiert (10 mM/l Natriumphosphat pH 7.2, 5 mM/l EDTA- Na_2). Dann wird SDS ad 0.1 % zugegeben. Danach wird die DNA mit 20 μ g/ml Pronase beziehungsweise Proteinase K 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verdau von Proteinen wird beendet, indem die SDS-Konzentration auf 1 % angehoben wird. Die wäßrige DNA-Lösung wird zweimal mit Phenol extrahiert. Das Phenol muß wassergesättigt und neutralisiert sein. Die wäßrige Phase, die nunmehr proteinfreie DNA enthalten sollte, wird zur Entfernung des Phenols gegen mehrere Wechsel 1/100 SSC dialysiert (1 x SSC ist 0.15 M/l NaCl und 0.015 M/l Natriumcitrat pH 7.0).

10. Herstellung von Filtern mit einzelsträngiger M13-DNA zur Hybridisation

Die proteinfreie DNA-Lösung wird 30 Minuten lang im ko-

chenden Wasserbad auf 97 °C erhitzt und anschließend in sterilisiertes 1/100 SSC mit 3 mM/l MgCl_2 (Gillespie, 1968) von 0 °C gekippt. Die dabei eintretende Verdünnung wird so gewählt, daß die Abkühlung rasch genug erfolgt und daß die für ein Hybridisationsfilter vorgesehene DNA-Menge sich anschließend in genau 5 ml befindet.

Die DNA-Lösung wird auf Reagenzgläschen verteilt. Jedes Gläschen erhält 5 ml DNA-Lösung; dazu werden unmittelbar vor dem Auftragen auf Nitrocellulose-Filter 2.5 ml 18 x SSC gegeben, die Salzkonzentration der Mischung beträgt somit 6 x SSC.

Das Auftragen der DNA auf Millipore-Nitrocellulose-Filter der durchschnittlichen Porengröße 0.45 μm geschieht durch Filtration. Jedes Filter wird mit 10 ml 6 x SSC vorgewaschen, dann wird die DNA-Lösung filtriert und das Filter mit 10 ml 6 x SSC nachgewaschen. Die Filtrationsgeschwindigkeit darf nicht größer sein als 10 ml pro Minute. Die Herstellung der Hybridisationsfilter sollte in der Kälte erfolgen.

Die Hybridisationsfilter werden über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt und dann 3 Stunden lang bei 80 °C im Vakuumofen getrocknet. Die Filter können längere Zeit im Exsikkator aufbewahrt werden.

H. Erläuterung von Abkürzungen und ausgewählten Begriffen

amber	siehe: amber-Mutante
Carrier	Radioaktiv markierte Substanzen sind auf Grund ihrer geringen Konzentration meist nur schlecht präzipitierbar. Daher wird ihnen zur Ausfällung nicht radioaktives Material als C. zugesetzt.
Ci	Curie
Cistron	Genetische Information, die die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette codiert.
count	Radioaktiver Impuls, der bei der Szintillationsmessung als Lichtblitz gemessen wird. Die Zahl der
cpm	"counts per minute" ist ein für jedes radioaktive Isotop charakteristischer Prozentsatz der radioaktiven Zerfälle pro Minute.
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAase	Desoxyribonuclease. Siehe auch: Nuclease.
DNA-Polymerase	Desoxyribonucleotide polymerisierendes Enzym; arbeitet abhängig von einer Matrize.
EC	Liste der Enzyme (Vgl. Comprehensive Biochemistry, Volume 13, Second Edition 1965, Elsevier)
EDTA-Na ₂	Dinatriumsalz der Äthylendinitrilotetraessigsäure; bindet divalente Kationen.
Eluat	bei der Säulenchromatographie: Puffer, der die Säule verläßt.
Expression	Ausprägung. Umsetzung einer auf der Stufe der DNA befindlichen genetischen Information in RNA und schließlich in Protein. Als Protein wird genetische Information wirksam.
Extrachromosomale DNA	Außerhalb der zellulären DNA vorkommende, kleinere DNA. Meist circuläre DNA. Siehe auch: Resistenzfaktoren.
funktionelles Protein	Protein, das eine Funktion als Enzym oder Regulator ausübt. Gegensatz: Strukturprotein.
Gen	Genetische Information, die die Aminosäuresequenz einer Polypeptidkette codiert. Die Aus-

	drücke "Gen" und "Cistron" sind heute praktisch äquivalent.
Genom	Gesamtmenge genetischer Information. Wichtige Aspekte sind das Molekulargewicht und die Länge des G.
Komplementation	Letalmutanten von Viren können überleben, wenn jeweils verschiedene Cistren betroffen sind. In der Zelle komplementieren sich die Funktionen gegenseitig. Existierende Mutanten werden auf diese Weise in Komplementationsgruppen eingeteilt, um die Zahl der vorhandenen Cistren eines Genoms abschätzen zu können.
Lyse	Auflösung einer virusinfizierten Zelle. Die Lyse läßt sich mit Lysozym und Detergens künstlich hervorrufen.
M	Mol. Molekulargewicht einer chemischen Substanz in Gramm. Häufig auch für Konzentrationsangaben benutzt: Mol pro Liter.
Mutante	Von einem Wildtyp abgeleitetes Derivat mit abweichendem Erbmerkmal. Amber-Mutante: Ein Codon ist in das Nucleotid-Triplett UAG umgewandelt, das im nicht-permissiven Wirt keine Aminosäure codiert. Im nicht-permissiven Wirt bricht die Polypeptidkette daher am amber-Codon ab. Der permissive Wirt hingegen setzt eine bestimmte Aminosäure ein, die meist nicht der ursprünglichen entspricht.
NTG	Nitrosoguanidin. Stark mutagen wirkende Substanz.
Nuclease	Enzym, das in der Lage ist, Polynucleotidketten zu schneiden. Siehe: DNAase, RNAase.
O.D.	Optische Dichte. $O.D. \frac{10}{260}$: Extinktion bei der Wellenlänge 260 mμ bei einer Schichtdicke von 10 mm. Synonym gebraucht: $E \frac{10}{260}$.
Peak	Anhäufung einer bestimmten Substanz im Gradienten oder im Gel
pfu	plaque forming unit, kleinste infektiöse Einheit eines Virus
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

Polypeptidkette	Aminosäurekette
Polynucleotidkette	Kette von Nucleotidphosphaten
primer	Kurze RNA, die als Startermolekül für DNA-Synthese fungiert.
Resistenzfaktor	Circuläre DNA, extra-chromosomal. Codiert die Fähigkeit, ein Antibiotikum zu inaktivieren.
RF I	doppelsträngige, circuläre, covalent-geschlossene Form der DNA
RF II	doppelsträngige, circuläre Form der DNA mit mindestens einem Kettenbruch auf einem der beiden DNA-Stränge
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonucleinsäure. Ribosomale RNA (rRNA), Matrisen-RNA (mRNA), Transfer-RNA (tRNA).
RNAase	Ribonuclease. mRNAase.
RNA-Polymerase	Ribonucleotide polymerisierendes Enzym
s	Sedimentationskonstante nach Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat, ein Detergens
Strukturprotein	Strukturkomponente in der belebten Natur. Gegensatz: funktionelles Protein.
Szintillationsmessung	Methode der Messung von Radioaktivität. Emittierte Elektronenstrahlen werden durch Szintillatoren in Lichtblitze umgewandelt.
TCA	Trichloressigsäure. Standardmittel zur Präzipitation von Nucleinsäuren.
Transcription	Überschreiben von DNA in RNA
Translation	Überschreiben von RNA in Polypeptide
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan

I. Literaturverzeichnis

Berücksichtigt wurde im wesentlichen Literatur bis Ende des Jahres 1974. In einigen wichtigen Fällen wurde auch Literatur des Jahres 1975 zitiert.

Adams, M.H. (1959): "Bacteriophages". Interscience Publishers, New York.

Alberts, B., Frey, L., and Delius, H. (1972): "Isolation and Characterization of Gene 5 Protein of Filamentous Bacterial Viruses". J. Mol. Biol. 68, 139 - 152.

Alberts, B., and Herrick, G. (1971): "DNA-Cellulose Chromatography". Methods in Enzymology, Vol. XXI, 198 - 217, Academic Press.

Altman, S. (1971): "Isolation of Tyrosine tRNA Precursor Molecules". Nature N.B. 229, 19 - 21.

Bautz, E.K.F. (1972): "Regulation of RNA Synthesis". Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 12, 129 - 160, Academic Press.

Bishop, D.H.L., Claybrook, J.E., and Spiegelman, S. (1967): "Electrophoretic Separation of Viral Nucleic Acids on Polyacrylamide Gels". J. Mol. Biol. 26, 373 - 387.

Blundell, M., Craig, E., and Kennell, D. (1972): "Decay Rates of Different mRNA in E. coli and Models of Decay". Nature N.B. 238, 46 - 49.

Blundell, M., and Kennell, D. (1974): "Evidence for Endonucleolytic Attack in Decay of lac Messenger RNA in Escherichia coli". J. Mol. Biol. 83, 143 - 161.

Boedtke, H. (1968): "Molecular Weight and Conformation of RNA". Methods in Enzymology, Vol. XII, Part B, 429 - 458, Academic Press.

- Bordier, C., and Dubochet, J. (1974): "Electron Microscopic Localization of the Binding Sites of Escherichia coli RNA Polymerase in the Early Promoter Region of T7 DNA". Eur. J. Biochem. 44, 617 - 624.
- Bremer, H., and Yuan, D. (1968): "RNA chain growth-rate in Escherichia coli". J. Mol. Biol. 38, 163 - 180.
- Brutlag, D., Schekman, R., and Kornberg, A. (1971): "A Possible Role for RNA Polymerase in the Initiation of M13 DNA Synthesis". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2826 - 2829.
- Burdon, R.H. (1971): "Ribonucleic Acid Maturation in Animal Cells". Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 11, 33 - 79, Academic Press.
- Chamberlin, M., McGrath, J., and Waskell, L. (1970): "New RNA Polymerase from Escherichia coli infected with Bacteriophage T7". Nature 228, 227 - 231.
- Chen, C.-Y., Hutchison III, C.A., and Edgell, M.H. (1973): "Isolation and Genetic Localization of Three ϕ X174 Promoter Regions". Nature N.B. 243, 233 - 236.
- Craig, E., Cremer, K., and Schlessinger, D. (1972a): "Metabolism of T4 Messenger RNA, Host Messenger RNA and Ribosomal RNA in T4-infected Escherichia coli B". J. Mol. Biol. 71, 701 - 715.
- Craig, E., Schlessinger, D., and Gurgo, C. (1972b): "Synthesis, No Synthesis, or Synthesis and Degradation of Ribosomal Ribonucleic Acid in Various Escherichia coli Strains Starved for an Amino Acid". J. Bacteriol. 111, 66 - 72.
- Cuypers, T., van der Ouderaa, F.J., and de Jong, W.W. (1974): "The Amino Acid Sequence of Gene 5 Protein of Bacteriophage M13". Biochem. Biophys. Res. Commun. 59, 557 - 563.
- Dennis, P.P. (1974): "Synthesis and Stability of Individual Ribosomal Proteins in the Presence of Rifampicin". Molec. gen. Genet. 134, 39 - 47.

- Dickerson, R.E. (1972): "X-Ray Studies of Protein Mechanisms". Chapter: "Actinomycin D". Ann. Rev. Biochem. 41, 838 - 841, Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- Dougan, A.H., and Glaser, D.A. (1974): "Rate of Chain Elongation of Ribosomal RNA Molecules in Escherichia coli". J. Mol. Biol. 87, 775 - 795.
- Duesberg, P.H., and Vogt, P.K. (1973): "Gel Electrophoresis of Avian Leukosis and Sarcoma Viral RNA in Formamide: Comparison with Other Viral and Cellular RNA Species". J. Virol. 12, 594 - 599.
- Dunn, J.J., and Studier, F.W. (1973): "T7 Early RNAs and Escherichia coli Ribosomal RNAs are Cut from Large Precursor RNAs In Vivo by Ribonuclease III". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3296 - 3300.
- Ennis, H.L. (1971): "Mutants of Escherichia coli Sensitive to Antibiotics". J. Bacteriol. 107, 486 - 490.
- Ezekiel, D.H., and Hutchins, J.E. (1968): "Mutations affecting RNA Polymerase associated with Rifampicin Resistance in Escherichia coli". Nature 220, 276 - 277.
- Fischer, L. (1971): "An Introduction to Gel Chromatography". North-Holland Publishing Company.
- Gariglio, P., and Green, M.H. (1973): "Characterization of Polycistronic Late Lambda Messenger RNA". Virology 53, 392 - 404.
- Gegenheimer, P., and Apirion, D. (1975): "Escherichia coli Ribosomal Ribonucleic Acids Are Not Cut from an Intact Precursor Molecule". J. Biol. Chem. 250, 2407 - 2409.
- Geiduschek, E.P., and Haselkorn, R. (1969): "Messenger RNA". Ann. Rev. Biochem. 38, 647 - 676, Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- Gesteland, R.F. (1966): "Isolation and Characterization of Ribonuclease I Mutants of Escherichia coli". J. Mol. Biol. 16, 67 - 84.

Gillespie, D., and Spiegelman, S. (1965): "A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membrane". J. Mol. Biol. 12, 829 - 842.

Gillespie, D. (1968): "The Formation and Detection of DNA-RNA Hybrids". Methods in Enzymology, Vol. XII, Part B, 641 - 668, Academic Press.

Godson, G.N., and Vapnek, D. (1973): "A Simple Method of Preparing Large Amounts of ϕ X174 RF I Supercoiled DNA". Biochim. Biophys. Acta 299, 516 - 520.

Goldberg, I.H., and Friedman, P.A. (1971): "Antibiotics and Nucleic Acids". Ann. Rev. Biochem. 40, 775 - 810, Ann. Rev. Inc., Palo Alto.

Green, M.H., Hayward, W.S., and Gariglio, P. (1970): "A Method for the Localization of Active Promoters". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 295 - 303.

Guthrie, G.D. (1971): "Translational Regulation of T4 Messenger RNA Metabolism". Biochim. Biophys. Acta 232, 324 - 337.

Halsall, H.B., and Schumaker, V.N. (1972): "Zonal Diffusion, a New Technique. Application to the Determination of the Molecular Weight of M13 Viral Deoxyribonucleic Acid". Biochemistry 11, 4692 - 4695.

Hayashi, M., Hayashi, M.N., and Spiegelman, S. (1963): "Restriction of In Vivo Genetic Transcription to One of the Complementary Strands of DNA". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 50, 664 - 672.

Hayashi, M.N., and Hayashi, M. (1972): "Isolation of ϕ X174 Specific Messenger Ribonucleic Acids In Vivo and Identification of Their 5' Terminal Nucleotides". J. Virol. 9, 207 - 215.

Hayashi, Y., and Hayashi, M. (1970): "Fractionation of ϕ X174 Specific Messenger RNA". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 171 - 177.

Heil, A., and Zillig, W. (1970): "Reconstitution of Bacterial DNA-dependent RNA-Polymerase from Isolated Subunits as a Tool for the Elucidation of the Role of the Subunits in Transcription". FEBS Lett. 11, 165 - 168.

Henry, T.J., and Brinton, C.C. (1971): "Removal of the Coat Protein of Bacteriophages M13 or fd from the Exterior of the Host after Infection". Virology 46, 754 - 763.

Henry, T.J., and Pratt, D. (1969): "The Proteins of Bacteriophage M13". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 62, 800 - 807.

Hercules, K., Schweiger, M., and Sauerbier, W. (1974): "Cleavage by RNase III Converts T3 and T7 Early Precursor RNA into Translatable Message". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 840 - 844.

d'Hérelle, F. (1921): "Le bactériophage: son rôle dans l'immunité". Masson, Paris.

Heyden, B., Nüsslein, C., and Schaller, H. (1972): "Single RNA Polymerase Binding Site Isolated". Nature N.B. 240, 9 - 12.

Hoffmann-Berling, H., and Mazé, R. (1964): "Release of male-specific bacteriophages from surviving host bacteria". Virology 22, 305 - 313.

Hofschneider, P.H., and Preuss, A. (1963): "M13 bacteriophage liberation from intact bacteria as revealed by electron microscopy". J. Mol. Biol. 7, 450 - 451.

Hohn, B., von Schütz, H., and Marvin, D.A. (1971): "Filamentous Bacterial Viruses. II. Killing of Bacteria by Abortive Infection with fd". J. Mol. Biol. 56, 155 - 165.

Jacob, E., and Hofschneider, P.H. (1969): "Replication of the Single-stranded DNA Bacteriophage M13: Messenger RNA Synthesis Directed by M13 Replicative Form DNA". J. Mol. Biol. 46, 359 - 363.

Jacob, E., Jaenisch, R., and Hofschneider, P.H. (1970): "Replication of the Small Coliphage M13: Evidence for Long-living M13 Specific Messenger RNA". Nature 227, 59 - 60.

- Jacob, E., Jaenisch, R., and Hofschneider, P.H. (1973): "Replication of the Single-Stranded DNA Bacteriophage M13. On the Transcription in vivo of the M13 Replicative-Form DNA". Eur. J. Biochem. 32, 432 - 443.
- Jacobson, A. (1972): "Role of F Pili in the Penetration of Bacteriophage f1". J. Virol. 10, 835 - 843.
- Jaenisch, R., Hofschneider, P.H., and Preuss A. (1969): "Isolation of Circular DNA by Zonal Centrifugation". Biochim. Biophys. Acta 190, 88 - 100.
- Jazwinski, S.M., Marco, R., and Kornberg, A. (1973): "A Coat Protein of the Bacteriophage M13 Virion Participates in Membrane-Oriented Synthesis of DNA". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 205 - 209.
- Jovin, M.T., Englund, P.T., and Bertsch, L.L. (1969): "Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid". J. Biol. Chem. 244, 2296 - 3008.
- Kennell, D.E. (1971): "Principles and Practices of Nucleic Acid Hybridization". Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 11, 259 - 301, Academic Press.
- Kindler, P., Keil, T.U., and Hofschneider, P.H. (1973): "Isolation and Characterization of a Ribonuclease III Deficient Mutant of Escherichia coli". Molec. gen. Genet. 126, 53 - 59.
- Kornberg, A. (1974): "DNA Synthesis". Freeman, San Francisco.
- Kuwano, M., Ning Kwan, C., Apirion, D., and Schlessinger, D. (1969): "Ribonuclease V of Escherichia coli. I. Dependence on Ribosomes and Translocation". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 64, 693 - 700.
- Lark, K.G. (1972): "Evidence for the Direct Involvement of RNA in the Initiation of DNA Replication in Escherichia coli 15 T⁻". J. Mol. Biol. 64, 47 - 60.
- Lin, N.S.-C., and Pratt, D. (1974): "Bacteriophage M13 Gene 2 Protein: Increasing Its Yield in Infected Cells, and Identification and Localization". Virology 61, 334 - 342.

- Lucas-Lenard, J., and Lipman, F. (1971): "Protein Biosynthesis". Ann. Rev. Biochem. 40, 409 - 448, Annual Reviews Inc., Palo Alto.
- Luria, S.E., and Darnell Jr., J.E. (1967): "General Virology". Second Edition. Wiley, New York.
- Lyons, L.B., and Zinder, N.D. (1972): "The Genetic Map of the Filamentous Bacteriophage f1". Virology 49, 45 - 60.
- Maaløe, O., and Hanawalt, P.C. (1961): "Thymine Deficiency and the Normal DNA Replication Cycle". J. Mol. Biol. 3, 144 - 155.
- Mangiarotti, G., and Turco, E. (1973): "Ribonuclease Activity in Escherichia coli Polyribosomes". Eur. J. Biochem. 38, 507 - 515.
- Marrs, B.L., and Yanofsky, C. (1971): "Host and Bacteriophage Specific Messenger RNA Degradation in T7-Infected Escherichia coli". Nature N.B. 234, 168 - 170.
- Marvin, D.A., and Hohn, B. (1969): "Filamentous Bacterial Viruses". Bacteriological Reviews 33, 172 - 209.
- Marvin, D.A., and Schaller, H. (1966): "The topology of DNA from the small filamentous bacteriophage fd". J. Mol. Biol. 15, 1 - 7.
- McQuillen, K., Roberts, R.B., and Britten, R.J. (1959): "Synthesis of Nascent Protein by Ribosomes in Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 45, 1437 - 1447.
- Meier, D., and Hofschneider, P.H. (1972): "Effect of Rifampicin on the Growth of RNA Bacteriophage M12". FEBS Lett. 25, 179 - 183.
- Miller, O.L., Beatty, B.R., Hamkalo, B.A., and Thomas Jr., C.A. (1970): "Electron Microscopic Visualization of Transcription". Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 35, 505 - 512.
- Morikawa, N., and Imamoto, F. (1969): "On the Degradation of Messenger RNA for the Tryptophan Operon in Escherichia coli". Nature 223, 37 - 40.

- Morse, D.E., Baker, R.F., and Yanofsky, C. (1968): "Translation of the Tryptophan Messenger RNA of *Escherichia coli*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 60, 1428 - 1435.
- Morse, D.E., Mosteller, R., Baker, R.F., and Yanofsky, C. (1969): "Direction of in vivo Degradation of Tryptophan Messenger RNA - A Correction". *Nature* 223, 40 - 43.
- Nakashima, Y., Dunker, A.K., Marvin, D.A., and Konigsberg, W. (1974): "The Amino Acid Sequence of a DNA Binding Protein, the Gene 5 Product of fd Filamentous Bacteriophage". *FEBS Lett.* 40, 290 - 292.
- Nikolaev, N., Silengo, L., and Schlessinger, D. (1973): "Synthesis of a Large Precursor to Ribosomal RNA in a Mutant of *Escherichia coli*". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 3361 - 3365.
- Nikolaev, N., and Schlessinger, D. (1974): "30 S Pre-ribosomal RNA of *Escherichia Coli* and Products of Cleavage by Ribonuclease III: Length and Molecular Weight". *J. Mol. Biol.* 86, 741 - 747.
- Oey, J.L., and Knippers, R. (1972): "Properties of the Isolated Gene 5 Protein of Bacteriophage fd". *J. Mol. Biol.* 68, 125 - 138.
- Ohnishi, Y., and Schlessinger, D. (1972): "Total Breakdown of Ribosomal and Transfer RNA in a Mutant of *Escherichia coli*". *Nature N.B.* 238, 228 - 231.
- Okamoto, T., Sugiura, M., and Takanami, M. (1972): "RNA Polymerase Binding Sites of Phage fd Replicative Form DNA". *Nature N.B.* 237, 108 - 109.
- Olsen, W.L., Staudenbauer, W.L., and Hofschneider, P.H. (1972): "Replication of Bacteriophage M13: Specificity of the *Escherichia coli* dnaB Function for Replication of Double-Stranded M13 DNA". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 2570 - 2573.
- Pato, M.L., and von Meyenburg, K. (1970): "Residual RNA Synthesis in *Escherichia coli* after Inhibition of Initiation of Transcription by Rifampicin". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35, 497 - 504.

Peacock, A.C., and Dingman, C.W. (1968): "Molecular Weight Estimation and Separation of Ribonucleic Acid by Electrophoresis in Agarose-Acrylamide Composite Gels". *Biochemistry* 7, 668 - 674.

Pratt, D., and Erdahl, W.S. (1968): "Genetic Control of Bacteriophage M13 DNA Synthesis". *J. Mol. Biol.* 37, 181 - 200.

Pratt, D., Tzagoloff, H., and Erdahl, W.S. (1966): "Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. I. Isolation, complementation, cell killing, time of cistron action". *Virology* 30, 397 - 410.

Pratt, D., Tzagoloff, H., and Beaudoin, J. (1969): "Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. II. Two genes for coat proteins". *Virology* 39, 42 - 53.

Puga, A., Borrás, M.-T., Tessman, E.S., and Tessman, I. (1973): "Difference Between Functional and Structural Integrity of Messenger RNA". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70, 2171 - 2175.

Rabussay, D., and Zillig, W. (1969): "A Rifampicin Resistant RNA-Polymerase from *E. coli* Altered in the beta-Subunit". *FEBS Lett.* 5, 104 - 106.

Ray, D.S. (1968): "The Small DNA-Containing Bacteriophages". In: "Molecular Basis of Virology", ed. by Fraenkel-Conrat, 222 - 254, Reinhold Book Corp., New York.

Reich, E., Cerami, A., and Ward, D.C. (1967): "Actinomycin". In: "Antibiotics, Volume I, Mechanism of Action", ed. by Gottlieb and Shaw, Springer, Berlin - Heidelberg - New York.

Riva, S., and Silvestri, L.G. (1972): "Rifamycins: A General View". *Ann. Rev. Microbiol.* 26, 199 - 224, Annual Reviews Inc., Palo Alto.

Roberts, J.W. (1969): "Termination Factor for RNA Synthesis". *Nature* 224, 1168 - 1174.

- Robertson, H.D., Webster, R.E., and Zinder, N.D. (1968): "Purification and properties of ribonuclease III from *Escherichia coli*". *J. Biol. Chem.* 243, 82 - 91.
- Rosenberg, M., Kramer, R.A., and Steitz, J.A. (1974): "T7 Early Messenger RNAs are the Direct Products of Ribonuclease III Cleavage". *J. Mol. Biol.* 89, 777 - 782.
- Salivar, W.O., Tzagoloff, H., and Pratt, D. (1964): "Some Physical-Chemical and Biological Properties of the Rod-Shaped Coliphage M13". *Virology* 24, 359 - 371.
- Salstrom, J.S., and Pratt, D. (1971): "Role of Coliphage M13 Gene 5 in Single-Stranded DNA Production". *J. Mol. Biol.* 61, 489 - 501.
- Scherrer, K. (1969): "Isolation and Sucrose Gradient Analysis of RNA". In: "Fundamental Techniques in Virology", Ed. Habel and Salzman, Academic Press.
- Schwartz, T., Craig, E., and Kennell, D. (1970): "Inactivation and Degradation of Messenger Ribonucleic Acid from the Lactose Operon of *Escherichia coli*". *J. Mol. Biol.* 54, 299 - 311.
- Sedat, J.W., and Sinsheimer, R.L. (1970): "The in vivo ϕ X mRNA". *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 35, 163 - 170.
- Sinsheimer, R.L. (1968): "Bacteriophage ϕ X174 and Related Viruses". *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, Vol. 8, 115 - 169, Academic Press.
- Smilowitz, H., Lodish, H., and Robins, P.W. (1971): "Synthesis of the Major Bacteriophage f1 Coat Protein". *J. Virol.* 7, 776 - 782.
- Staudenbauer, W.L., and Hofschneider, P.H. (1972a): "Replication of Bacteriophage M13. Mechanism of Single-Strand DNA Synthesis in an *Escherichia coli* Mutant Thermosensitive in Chromosomal DNA-Replication". *Eur. J. Biochem.* 30, 403 - 412.

- Staudenbauer, W.L., and Hofschneider, P.H. (1972b): "Replication of Bacteriophage M13: Inhibition of Single-Strand DNA Synthesis by Rifampicin". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 69, 1634 - 1637.
- Staudenbauer, W.L., and Hofschneider, P.H. (1973): "Replication of Bacteriophage M13. Positive Role of Gene 5 Protein in Single-Strand DNA Synthesis". *Eur. J. Biochem.* 34, 569 - 576.
- Staynov, D.Z., Pinder, J.C., and Gratzer, W.B. (1972): "Molecular Weight Determination of Nucleic Acids by Gel Electrophoresis in Non-aqueous Solution". *Nature N.B.* 235, 108 - 110.
- Steitz, J.A. (1969): "Polypeptide Chain Initiation: Nucleotide Sequences of the Three Ribosomal Binding Sites in Bacteriophage R17 RNA". *Nature* 224, 957 - 964.
- Stent, G.S. (1963): "Molecular biology of bacterial Viruses". Freeman, San Francisco.
- Studier, W.F. (1973): "Analysis of Bacteriophage T7 Early RNAs and Proteins on Slab Gels". *J. Mol. Biol.* 79, 237 - 248.
- Sugiura, M., Okamoto, T., and Takanami, M. (1969): "Starting Nucleotide Sequences of RNA synthesized on the Replicative Form DNA of Coliphage fd". *J. Mol. Biol.* 43, 299 - 315.
- Takanami, M., Okamoto, T., and Sugiura, M. (1971): "Termination of RNA Transcription on the Replicative Form DNA of Bacteriophage fd". *J. Mol. Biol.* 62, 81 - 88.
- Tocchini-Valentini, G.P., Marino, P., and Colvill, A.J. (1968): "Mutant of E. coli containing an Altered DNA-dependent RNA Polymerase". *Nature* 220, 275 - 276.
- Tonegawa, S., and Hayashi, M. (1966): "The direction of in vitro genetic transcription on circular DNA". *Biochim. Biophys. Acta* 123, 634 - 637.
- Trenkner, E., Bonhoeffer, F., and Gierer, A. (1967): "The fate of the protein component of bacteriophage fd during infection". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 932 - 939.

Watson, J.D. (1970): "Molecular Biology of the Gene". Second Edition. Benjamin, New York.

Wehrli, W., and Staehelin, M. (1971): "Actions of the Rifamycins". Bacteriol. Rev. 35, 290 - 309.

Weiner, J.H., Bertsch, L.L., and Kornberg, A. (1975): "The Deoxyribonucleic Acid Unwinding Protein of Escherichia coli". J. Biol. Chem. 250, 1972 - 1980.

Wheeler, F.C., Benzinger, R.H., and Bujard, H. (1974): "Double-Length, Circular, Single-Stranded DNA from Filamentous Phage". J. Virol. 14, 620 - 630.

Wickner, R.B., Wright, M., Wickner, S., and Hurwitz, J. (1972): "Conversion of ϕ X174 and fd Single-Stranded DNA to Replicative Forms in Extracts of Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 3233 - 3237.

Wickner, S., and Hurwitz, J. (1974): "Conversion of ϕ X174 Viral DNA to Double-Stranded Form by Purified Escherichia coli Proteins". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4120 - 4124.

Wickner, W., Brutlag, D., Schekman, R., and Kornberg, A. (1972): "RNA Synthesis Initiates In Vitro Conversion of M13 DNA to Its Replicative Form". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 965 - 969.

Wickner, W., and Kornberg, A. (1974): "A Novel Form of RNA Polymerase from Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4425 - 4428.

Wright, M., Wickner, S., and Hurwitz, J. (1973): "Studies on In Vitro DNA Synthesis. Isolation of dnaB Gene Product from Escherichia coli". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70, 3120 - 3124.

Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Benzinger, R., Lawhorne, L., and Treiber, G. (1970): "Rapid Bacteriophage Sedimentation in the Presence of Polyethylene Glycol and Its Application to Large-Scale Virus Purification". Virology 40, 734 - 744.

Zinder, N.D., and Cooper, S. (1964): "Host-dependent mutants of the bacteriophage f2. I. Isolation and preliminary classification". *Virology* 23, 152 - 158.

Lebenslauf

Am 21. Dezember 1944 wurde ich in Berlin als Sohn der Eheleute Anneliese Wanner, geb. Thom, und Dr. jur. Karl Wanner geboren.

Von 1951 ab besuchte ich die Volksschule und von 1955 ab das Rethel-Gymnasium in Düsseldorf. Dort legte ich am 14. Februar 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1964 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Tübingen. Im September 1966 bestand ich die ärztliche Vorprüfung.

Vom Wintersemester 1967/68 ab setzte ich mein Studium an der Universität München fort. Im Dezember 1969 bestand ich in München die ärztliche Prüfung.

Im Jahre 1970 war ich fünf Monate als Medizinalassistent tätig. Dann erhielt ich ein Ausbildungsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft und begann mit meiner Doktorarbeit in der Abteilung für Virusforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in München.

Im April 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt. Seit April 1973 arbeite ich als Wissenschaftlicher Assistent in der Abteilung für Virusforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie.

